

**Drei T-Antigen-Subklassen
des Simian Virus 40
aus lytisch infizierten Zellen:
Oligomerisierung, Origin-DNA-Bindung,
Versuche zur Reinigung**

Robert Runzler

Disbui. München

1988

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Drei T-Antigen-Subklassen des Simian
Virus 40 aus lytisch infizierten Zellen:
Oligomerisierung, Origin-DNA-Bindung,
Versuche zur Reinigung

vorgelegt von

Robert Runzler

aus

München

am

14. September 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning-Honegger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.88

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

"So beruht die neuere Chemie hauptsächlich darauf,
das zu trennen, was die Natur vereinigt hatte;
wir heben die Synthese der Natur auf,
um sie in getrennten Elementen kennenzulernen."

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1984 bis September 1988 auf Anregung von Frau Prof. Dr. E. Fanning-Honegger am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Frau Prof. Dr. E. Fanning-Honegger möchte ich besonders herzlich für das entgegengebrachte Interesse und die Unterstützung, die sie dieser Arbeit jederzeit zuteil werden ließ, danken. Auch danke ich ihr für die vielen Anregungen und hilfreichen Diskussionen, die den Fortgang der Arbeit unterstützten, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mein besonderer Dank gilt auch unseren ehemaligen technischen Assistentinnen Ursula Markau, Gabi Hartmann und Andrea Schmid für ihre fleißige Mithilfe im Labor. Ebenfalls möchte ich unseren jetzigen technischen Assistentinnen Sabine Domrath, Birgit Posch und Silke Dehde für ihre tatkräftige Mithilfe und die zahlreichen Unterstützungen im Labor ein ganz herzliches Dankeschön aussprechen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Arbeitskreises und des Instituts für das freundliche Arbeitsklima und die hilfreichen und weiterführenden Diskussionen.

Meinem Freund Dr. Bernhard Kempster und Frau Irene Dornreiter, die mir auch die monoklonalen Antikörper Pab 419 zur Verfügung stellte, gilt mein ganz besonderer Dank für die Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Ismail Moarefi danke ich für die Benützung seines Computers zur Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Wolf danke ich für die Bereitstellung des Densitometers Elscript 400.

Frau J. Espen danke ich für die Einführung in die Affinitätschromatographie.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Simian Virus 40 (SV40)	1
1.2 Das Virusgenom	3
1.3 Infektionsablauf und Vermehrung des SV40-Virus	5
1.4 Das große Tumor-Antigen (T-Antigen)	7
1.5 Interaktionen zwischen T-Antigen und SV40-DNA	10
1.6 Aufgabenstellung	13
2. Material	16
2.1 Zelllinien	16
2.2 Virusstämme	17
2.3 Plasmide	17
2.4 Seren und Medien	17
2.5 Enzyme	18
2.6 Chemikalien und weitere Materialien	18
3. Methoden	21
3.1 Zellkultivierung	21
3.2 Aufzucht der Viren	22
a) SV40	22
b) Ad5SVRII5	22
c) 373T-Baculovirus	23
3.3 Infektion von Zellen	23
a) TC7-Zellen	23
b) 293-Zellen	25
c) Sf9-Zellen	25



3.4	Bestimmung von Virustitern	25
3.5	Anfärben von Zellen durch die Immunperoxidase-Färbung	26
3.6	Enzymatische Reaktionen mit DNA	27
3.6.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	27
3.6.2	Präparation der alkalischen Phosphatase für die DNA-Dephosphorylierungsreaktion	27
3.6.3	Radioaktive Markierung der 5'-Enden nach DNA-Spaltung	27
	a) Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	27
	b) 5'-Endmarkierung der dephosphorylierten DNA mit T4-Polynukleotid-Kinase	28
3.7	Isolierung der T-Antigen-Subklassen	28
3.7.1	Herstellung von T-Antigen-enthaltendem Zellextrakt für die Dichtegradientenzentrifugation	28
3.7.2	Herstellung der Saccharose-Dichtegradienten	29
3.7.3	Dichtegradientenzentrifugation der Zellextrakte	30
3.7.4	Nachweis der Markerproteine	30
	a) β -Galaktosidase	30
	b) Alkalische Phosphatase	31
	c) Hämoglobin	31
3.8	"Target-bound Assay" (Hinzpeter et al., 1986)	31
3.9	Präparation von <u>Staphylococcus aureus</u>	33
3.10	Reinigung von monoklonalen Antikörpern (Ey et al., 1978)	33
3.11	Isolierung der SV40-DNA nach Hirt (1967)	34
3.12	Agarosegelelektrophorese	35
3.13	Messung der Radioaktivität in Gelstücken	36
3.14	Dot-Blot-Analyse zur relativen Mengenbestimmung der T-Antigen-Subklassen	36
3.14.1	Bestimmung auf der Basis von ^{125}I	36
3.14.2	Biotin-Streptavidin-System (Amersham und Buchler)	36
3.14.3	ProtoBlot Immunoscreening System (Promega Biotec)	38
3.15	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1979)	38

3.16	Anfärbung der Polyacrylamid-Gele	39
3.16.1	Coomassie-Färbung (Weber and Osborn, 1969)	39
3.16.2	Silberfärbung nach Wray et al. (1981)	40
3.17	Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose (Western Blot, Towbin et al., 1979)	40
3.18	Spezifischer Nachweis der T-Antigen-Banden auf Nitrozellulose mit dem ProtoBlot Immunoscreening System (Promega Biotec)	41
3.19	Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bradford, 1976)	42
3.20	Präparation des Säulenmaterials für die Affinitätschromatographie	42
3.21	Reinigung von T-Antigen durch die Affinitätschromatographie	46
3.21.1	Aufschluß der Zellen	46
3.21.2	Erste Vorreinigung des Zellextraktes	46
3.21.3	Zweite Vorreinigung des Zellextraktes	46
3.21.4	Bindung des T-Antigens an die Affinitätssäule	47
3.21.5	Reinigungsschritte der Affinitätssäule	47
3.21.6	Elution des T-Antigens	47
4.	Ergebnisse	48
4.1	Oligomerisierung von neu synthetisiertem T-Antigen	48
4.2	Bindung der verschiedenen T-Antigen-Subklassen an die pSV-wt DNA	52
4.3	Bindung der T-Antigen-Subklassen an pSV-wt DNA und pON-wt DNA	55
4.4	Affinität der T-Antigen-Bindung an die SV40-DNA	59
4.5	Spezifische Aktivität der T-Antigen-DNA-Bindung	63
4.6	Unterschiedliche spezifische Aktivität der T-Antigen-DNA-Bindung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion	67
4.7	Dissoziation der T-Antigen-Oligomere in Gegenwart von EDTA	72

4.8	Einfluß von $MgCl_2$ bzw. EDTA auf die Origin-DNA-Bindungsaktivität der T-Antigen-Subklassen	75
4.9	Einfluß verschiedener Metallkationen auf die DNA-Bindung	79
4.10	Reinigung des T-Antigens mit der Affinitätschromatographie	82
4.10.1	Affinitätschromatographische Reinigung des T-Antigens aus COS-1	82
4.10.2	Reinigung des T-Antigens aus, mit Ad5SVRI15 infizierten, 293-Zellen	89
4.10.3	Reinigung des T-Antigens aus, mit 373T-Baculovirus infizierten, Sf9-Zellen	91
5.	Diskussion	93
6.	Zusammenfassung	103
7.	Literaturverzeichnis	105
8.	Verzeichnis der Abkürzungen	120

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	<u>Cercopithecus aethiops sabaeus</u>	2
Abb. 2:	Schematische Darstellung des SV40-Genoms (in Abwandlung von Fiers et al., 1978)	4
Abb. 3:	Funktionelle Bereiche auf dem SV40 T-Antigen	9
Abb. 4:	Bereich des Replikationsursprungs mit den Bindungsstellen für das T-Antigen	11
Abb. 5:	Darstellung von uninfizierten und infizierten Si9-Zellen in Dunkelfeldmikroskopie	24
Abb. 6:	Kontrolle der Säulenmaterialpräparation für die Affinitätschromatographie	44-45
Abb. 7:	Fraktionierung von neu synthetisiertem T-Antigen nach Dichtegradientenzentrifugation	50-51
Abb. 8:	Vergleich der Bindung von T-Antigen-Subklassen in zwei unterschiedlichen Bindungsmethoden	53-54
Abb. 9:	T-Antigen-Subklassen-Bindung an pSV-wt DNA und pON-wt DNA	57-58
Abb. 10:	Beispiel für ein Scatchard-Diagramm, stellvertretend für alle Affinitätsstudien	60-61
Abb. 11:	DNA-Bindungsaktivität der T-Antigen-Subklassen als Funktion der T-Antigen-Menge	65-66

Abb. 12:	Spezifische Aktivität der DNA-Bindung an die SV40-DNA als Funktion der Zeit nach Infektion	68-70
Abb. 13:	Dissoziation der tetrameren T-Antigen-Suklasse unter EDTA-Einfluß	73-74
Abb. 14:	Einfluß von verschiedenen EDTA- und $MgCl_2$ -Konzentrationen auf die DNA-Bindung	76-78
Abb. 15:	Einfluß verschiedener Metallkationen auf die DNA-Bindung der T-Antigen-Subklassen	80-81
Abb. 16A:	Reinigungsexperiment von T-Antigen aus COS-1-Zellen durch die Affinitätschromatographie	84
Abb. 16B:	Western-Blot, angefärbt mit dem ProtoBiot-System	85
Abb. 17:	"Target-bound Assay" mit T-Antigen aus der Affinitätschromatographie	87
Abb. 18:	"Target-bound Assay" mit T-Antigen: Elution mit 3.5 M $MgCl_2$, 10% Glycerin pH 7.0	88
Abb. 19:	T-Antigen-Reinigung aus 293-Zellen durch die Affinitätschromatographie	90
Abb. 20:	Modell für die Oligomerisierung und Origin DNA-Bindung der T-Antigen-Subklassen	98-99

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1:	Bindungsaffinität der T-Antigen-Subklassen für die pSV-wt DNA und die pON-wt DNA	62
---------	--	----

1. Einleitung

Das Simian Virus 40 (SV40) ist ein DNA-Tumorstoff, das 1960 entdeckt wurde (Sweet and Hilleman, 1960) und stellt seit dieser Zeit wegen seines relativ einfachen Aufbaus ein beliebtes Untersuchungsobjekt in der Molekularbiologie dar. Wie auch andere Viren, dient das SV40-Virus als Modellsystem, um genetische Prozesse, wie DNA-Replikation, Transkription oder die Regulation der Genexpression in Eukaryonten zu studieren.

SV40 gehört zur Gruppe der Papovaviren. Darin sind die "Vakuolisierenden Viren", die menschlichen JC- und BK-Typ-Viren, die Papilloma-Viren und Polyoma-Viren zusammengefaßt und es wurden auch Gemeinsamkeiten in der Genomorganisation gefunden (Melnick, 1962). Wegen dieser Gemeinsamkeiten mit humanpathogenen Tumorstoffen stellt SV40 ein wichtiges experimentelles Untersuchungsobjekt für die Aufklärung von genetischen Vorgängen dar, die bei der Entartung gesunder Zellen, bei der Tumorentstehung und der eukaryontischen Zelltransformation ablaufen.

1.1 Das Simian Virus 40 (SV40)

(Übersicht: Tooze, 1981)

Das SV40-Virus stammt aus der Grünen Meerkatze Cercopithecus aethiops sabaeus (Abb. 1). Dieses Virus wurde erst relativ spät entdeckt, als Zellkulturen der Grünen Meerkatze, die zur Herstellung von Impfstoffen gegen Polioviren dienten, auf endogene Viren untersucht wurden. In Rhesusaffen selbst zeigt das Virus nur schwer erkennbare zytopathische Effekte. Die Affennierenzellen sind für SV40 permissiv. Das SV40-Virus kann sich in diesen Zellen vollständig replizieren und durch lytische Infektion vermehren.



Abb. 1: Cercopithecus aethiops sabaesus

Diese Grüne Meerkatze ist ein Wirt des SV40-Virus.
Kopfbild aus "Arendt's Naturhistorischer Bildatlas", Leipzig 1892
Gesamtansicht aus "Grzimeks Tierleben", div 1979

Das Viruspartikel hat einen Durchmesser von ungefähr 45 nm und besteht aus DNA umgeben von einer ikosaedrischen Kapsidhülle. Die DNA bildet mit Wirtszellhistonen, die zu Nukleosomen zusammengelagert sind, einen Chromatin-Komplex. Die Proteinhülle besteht aus einer großen Anzahl der Virusproteine VP 1, VP 2 und VP 3. Das Virusgenom liegt als ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Molekül mit 5243 Basenpaaren vor (Fiers et al., 1978; Reddy et al., 1978) und kodiert, soweit bisher bekannt, für sechs Proteine. In infizierten Zellen liegt das SV40-Genom komplexiert mit Histonen als ein Minichromosom vor. Die Nukleoproteinstruktur ist hierbei analog dem zellulären Chromatin.

1.2 Das Virusgenom

Die DNA kodiert für zwei Teilregionen, die vom Replikationsursprung (origin of replication, ori) bidirektional abgelesen werden (Abb. 2). Zuerst werden die Gene für das große (T-) und das kleine (t-) Tumorantigen transkribiert. Diese zwei Proteine, die "früh" nach Infektion (early region) exprimiert werden, sind regulatorische Proteine.

Erst während oder nach Initiation der Replikation werden "spät" im Infektionsablauf (late region) die Gene der übrigen Proteine vom Origin in der Gegenrichtung transkribiert. Dabei handelt es sich bei den Virusproteinen VP 1, VP 2 und VP 3 um Strukturproteine, während das Agnoprotein, das erst bei der Virusreifung nachweisbar wird, an der richtigen Virusverpackung und Freisetzung reifer Viruspartikel beteiligt ist (Carswell and Alwine, 1986; Resnick and Shenk, 1986).

Der Bereich am Replikationsursprung zwischen den "frühen" und "späten" Genen stellt die Kontrollregion dar, in der wichtige Signale für die Genexpression und die DNA-Replikation liegen.

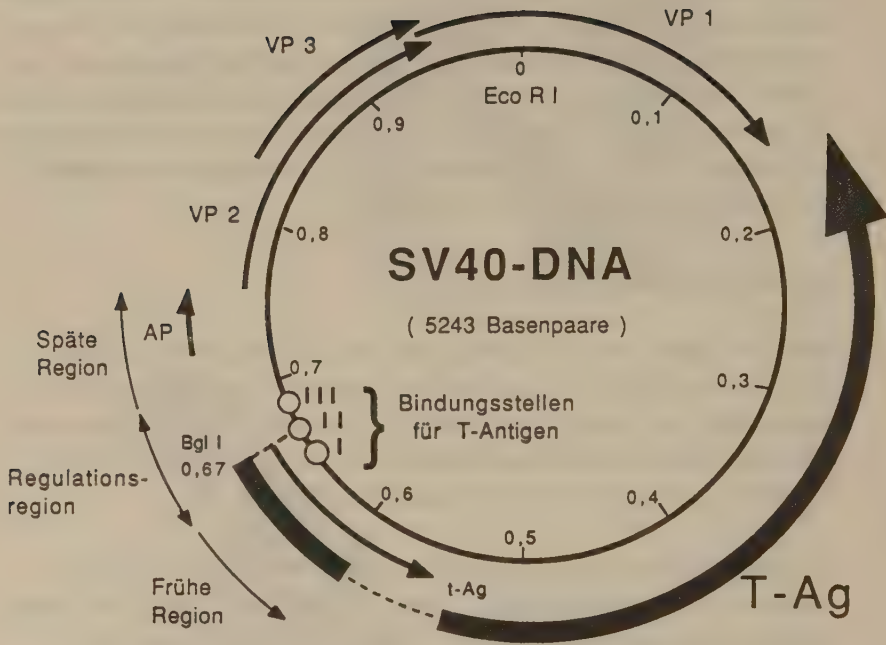


Abb. 2: Schematische Darstellung des SV40-Genoms
(in Abwandlung von Fiers et al., 1978)

Das zirkuläre, doppelsträngige SV40-Genom mit 5243 bp ist hier in Kartierungseinheiten, ausgehend von der einzigen EcoRI-Schnittstelle, dargestellt. Im Bereich der BglI-Stelle liegen die drei Bindungsstellen für T-Antigen, gleichzeitig befindet sich hier der Startpunkt der Replikation (Origin). Die frühe Region codiert für die Gene des kleinen t-Antigens und des großen T-Antigens. Die späte Region enthält die Gene für die Strukturproteine VP 1, VP 2, VP 3 und das Agnoprotein (AP).

Die physikalische Genkarte des Simian Virus 40 wird von den Schnittstellen der Restriktionsnukleasen EcoRI und BglII bestimmt. Beide Restriktionsenzyme schneiden die SV40-DNA jeweils nur einmal.

Die EcoRI-Schnittstelle definiert Anfang und Ende der Genkarte, die von dieser Schnittstelle aus im Uhrzeigersinn in Kartierungseinheiten von 0 bis 1 eingeteilt wird. Der Replikationsursprung befindet sich nach dieser Einteilung bei 0,67 Kartierungseinheiten (Tooze, 1981). Die BglII-Restriktionsschnittstelle liegt im Replikationsursprung inmitten einer Palindromsequenz von 27 bp. Genau in der Mitte dieser Palindromsequenz beginnt die Numerierung der Nukleotidsequenz im Uhrzeigersinn von 0 bis 5243.

1.3 Infektionsablauf und Vermehrung des SV40-Virus

(Übersicht: Tooze, 1981; DePamphilis and Bradley, 1986)

Nach dem Anheften eines Viruspartikels an die Zelloberfläche von permissiven Zellen (z. B. Affennierenzellen) gelangt das Virus zunächst in das Zytoplasma und dann in den Kern. Dort wird die Proteinhülle von zellulären Enzymen abgebaut und so der virale Chromatinkomplex freigesetzt. Die im Kern befindliche virale DNA wird transkribiert, mRNA wird synthetisiert, prozessiert und in das Zytoplasma zu den Ribosomen transportiert. Bereits 10-12 h nach der Virusinfektion sind die zwei Proteine (T- und t-Antigen) der "frühen" Gene nachweisbar.

Das T-Antigen spielt im weiteren Infektionsverlauf eine außerordentlich wichtige Rolle. Dieses Protein steigert u. a. die Synthese einiger wichtiger zellulärer Proteine (z. B. DNA-Ligase, DNA-Polymerase α), es regt die Replikation viraler DNA in hoher Kopienzahl an und stimuliert die Synthese zellulärer DNA und RNA, die ca. 12-15 h nach Infektion beginnt. Außerdem reguliert das T-Antigen die Transkription der späten Gene, es werden die Virushüllproteine VP 1, VP 2, VP 3 und zuletzt das Agnoprotein hergestellt. So können ca. 25 h nach Infektion neue Virus-

partikel in der Zelle akkumulieren, die dann ungefähr 70 h nach Infektion zur Lysis mit der Freisetzung einer großen Zahl neuer Viruspartikel und zum Zelltod führen.

Während sich SV40 in Affenzellen lytisch vermehrt, führt eine Infektion in nicht-permissiven Zellen (z. B. Mauszellen) zur Ausbildung und Aufrechterhaltung eines zellulären Transformationszustandes (Tooze, 1981; Rigby and Lane, 1983). In diesen Zellen wird zwar das Virus-Genom in die zelluläre DNA integriert, jedoch nur die "frühen" Gene exprimiert. Die virale DNA kann sich nicht vermehren und auch die "späte" Transkription ist blockiert. So werden keine Viruspartikel gebildet und freigesetzt. Wenn SV40-Viren oder SV40-transformierte Zellen in geeignete Tiere injiziert werden, kann sich ein Tumor ausbilden (Defendi and Jensen, 1967).

Aus Experimenten mit Deletionsmutanten, die kein kleines t-Antigen exprimieren (Lewis and Martin, 1979; Martin et al., 1979; Topp et al., 1981) und durch Versuche mit temperatursensitiven, nur das große T-Antigen betreffende tsA-Mutanten (Martin, 1981) fand man, daß das große T-Antigen die Hauptrolle in der Initiation und Aufrechterhaltung der Transformation spielt. Das kleine t-Antigen ist weder für die Transformation in vitro noch für die Tumorentstehung in vivo essentiell. Die genaue Funktion des kleinen t-Antigens ist bis heute nicht bekannt, es scheint für die produktive Infektion in Zellkulturen notwendig zu sein und die Transformationsfähigkeit des großen T-Antigens zu unterstützen (Sleigh et al., 1978; Graessmann et al., 1980; Topp and Rifkin, 1980). Eine Rolle bei Virusinfektionen in Affen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

1.4 Das große Tumor-Antigen (T-Antigen)

Auf Grund der vielfältigen biologischen Funktionen, die das große T-Antigen in SV40 infizierten oder transformierten Zellen ausübt, hat sich dieses Protein zum Hauptgegenstand der SV40-Forschung entwickelt.

Das große T-Antigen ist ein Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 81 kD (Livingston and Bradley, 1987). Der größte Anteil des T-Antigens ist im Zellkern lokalisiert (Pope and Rowe, 1964). Hier ist dieses Protein mit dem Nukleoplasma (65%), dem Chromatin (15%) und der Kernmatrix (20%) assoziiert (Staufenbiel and Deppert, 1983; Covey et al., 1984). Ein kleiner Teil des T-Antigens kommt in der Plasmamembran vor (Soule and Butel, 1979; Deppert et al., 1980).

Das C-terminale Ende stellt eine eigenständige, funktionelle Domäne dar (Tornow et al., 1985). Sie ist nötig für eine effiziente Infektion der meisten Affennierenzelllinien durch humane Adenoviren (Fey et al., 1979; Prives et al., 1980) und zeigt somit Helferfunktion. Aber auch für SV40-Nachkommenviren in bestimmten Affennierenzelllinien besitzt diese Domäne wichtige Funktionen (Manos and Gluzman, 1985; Tornow et al., 1985).

Das T-Antigen kommt in verschiedenen aggregierten Formen vor. Eine monomere Form dient als Vorläufer für eine tetramere Form (Fanning et al., 1981; Fanning et al., 1984). Der Phosphorylierungsgrad der jeweiligen Form scheint im Aggregationsprozeß eine ausschlaggebende Rolle zu spielen (Baumann and Hand, 1982). Mit dem zellulären Phosphoprotein p53 bildet das T-Antigen einen Komplex sowohl in transformierten als auch in lytisch infizierten Zellen (Rigby and Lane, 1983; Braithwaite et al., 1987; Gannon and Lane, 1987).

Das T-Antigen weist eine Reihe verschiedener biochemischer Aktivitäten auf: Es kann an virale und zelluläre DNA binden (Tegtmeyer,

1975; Jessel et al., 1976; Tjian, 1978; Prives et al., 1980), ebenso kann es Nukleotide binden und ATP bzw. dATP spalten (Giacherio and Hager, 1979; Clark et al., 1981; Clertant and Cuzin, 1982; Clertant and Seif, 1983; Bradley et al., 1984; Bradley et al., 1987).

Durch biochemische und genetische Untersuchungen konnten einige der Eigenschaften des T-Antigens bestimmten Domänen zugeordnet werden (Abb. 3). Monoklonale Antikörper, die gegen Aminosäuresequenzen gerichtet sind, die durch die Genkarteneinheiten 0.33 bis 0.28 (map units) definiert sind, unterbinden spezifisch die ATPase-Aktivität des T-Antigens. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die funktionelle Domäne der ATPase-Aktivität ungefähr im Bereich der Aminosäuren 430 bis 510 liegt (Clark et al., 1981). Studien mit Deletionsmutanten (Clark et al., 1983) bestätigten diese Ergebnisse und zeigten zugleich, daß zusätzliche Regionen (Genkarteneinheiten 0.42-0.34 und 0.23-0.20) für die ATPase-Aktivität benötigt werden. Cole et al. (1986) zeigte schließlich, daß die tatsächliche ATPase-Domäne relativ groß ist und sich vom Zentrum des T-Antigens bis nahe dem C-Terminus erstreckt. Außerdem wird dieser Bereich für die Helikase-Aktivität benötigt (Stahl et al., 1986; Wiekowski et al., 1987).

Studien mit Deletionsmutanten waren es auch, die vermuten ließen, daß Aminosäuresequenzen (Aminosäuren 83-265), die den Genkarteneinheiten (map units) zwischen 0.43 und 0.54 entsprechen, nötig sind für die DNA-Bindung des T-Antigens an den Replikationsursprung der SV40-DNA (Shortle et al., 1979; Polvino-Bodnar and Cole, 1982; Clark et al., 1983). Verschiedene Arbeitskreise konnten die DNA-Bindungsdomäne im N-terminalen Bereich des T-Antigens genauer abgrenzen und so einem Aminosäurebereich von 131-259 zuschreiben (Prives et al., 1982; Clark et al., 1983; Paucha et al., 1986; Simmons, 1986; Arthur et al., 1988). Genetische und biochemische Untersuchungen zeigten, daß diese DNA-Bindung des T-Antigens gerade für die Auslösung der viralen DNA-Replikation und für die Autoregulation der frühen viralen Transkription

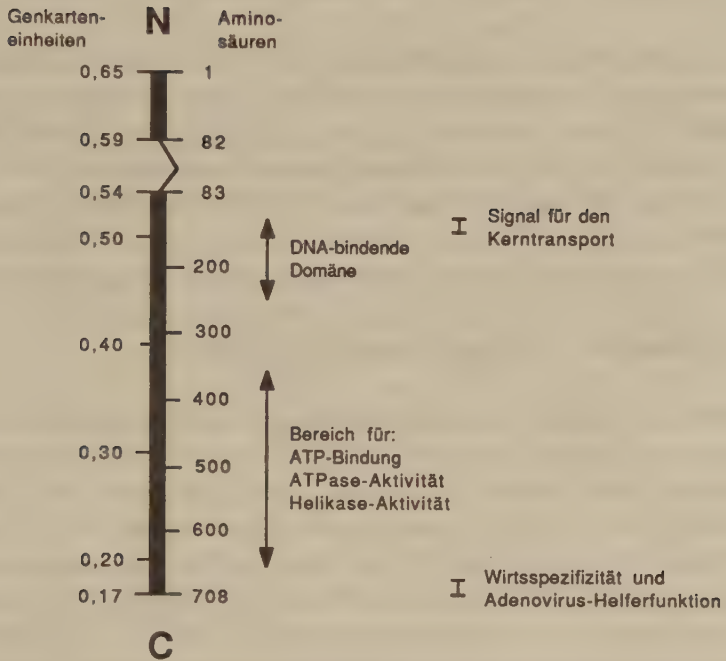


Abb. 3: Funktionelle Bereiche auf dem SV40 T-Antigen
(modifiziert nach Cole et al., 1986)

Die Zahlen auf der linken Seite entsprechen den Kartierungseinheiten der SV40-DNA, bezogen auf die EcoRI-Schnittstelle (Splice-Bereich von 0.59 bis 0.54). Die Zahlen auf der rechten Seite geben die Aminosäuren des T-Antigens an (N - Aminoterminus, C - Carboxyterminus).

verantwortlich ist (Shortle and Nathans, 1979; Shortle et al., 1979; DiMaio and Nathans, 1980; Rio et al., 1980; Hansen et al., 1981; Myers et al., 1981, DiMaio and Nathans, 1982). Unmittelbar am Beginn der DNA-Bindungsdomäne befindet sich im Aminosäurebereich 126-132 das Signal für den Transport des T-Antigens in den Zellkern (Kalderon et al., 1984).

Die Domänen des T-Antigens agieren scheinbar nicht unabhängig voneinander. Ein Beispiel hierfür wurde in unserem Arbeitskreis gefunden: Durch die Zugabe von ATP wird die spezifische Bindung des T-Antigens an den SV40-Replikationsursprung allosterisch gehemmt (Fanning and Vogt, 1986; Vogt et al., 1986). Bei hohem Überschuß von T-Antigen wird die sequenzspezifische Bindung an die SV40-DNA durch ATP-Zugabe jedoch erhöht (Deb and Tegtmeyer, 1987; Dodson et al., 1987).

1.5 Interaktionen zwischen T-Antigen und SV40-DNA

Reed et al. (1975) haben gezeigt, daß das T-Antigen bevorzugt im Regulationsbereich von SV40 bindet. Von mehreren Arbeitskreisen konnte gezeigt werden, daß es sich um drei spezifische Bindungsstellen des T-Antigens auf dem viralen Genom handelt (Abb. 4): Bindungsstelle I liegt auf der "frühen" Seite des Replikationsursprungs, Bindungsstelle II überlappt mit dem genetisch definierten "minimal origin" (Startpunkt der Replikation). Eine in der Literatur nicht ganz unumstrittene Bindungsstelle III befindet sich auf der "späten" Seite des Replikationsursprungs. An diese Bindungsstelle bindet das T-Antigen nur noch schwach, während der Transkriptionsfaktor Sp 1 an diese und benachbarte Sequenzen gut bindet, so daß die Funktion dieser Bindungsstelle nach wie vor unklar ist (Dyanan and Tjian, 1983; Schirmbeck and Deppert, 1988).

Weitere Untersuchungen bestätigten die Existenz spezifischer Erkennungssequenzen für T-Antigen (Tjian, 1978; Tegtmeyer et al., 1981; DeLucia et al., 1983; Mastrangelo et al., 1985; Ryder et al., 1985). Bei dieser

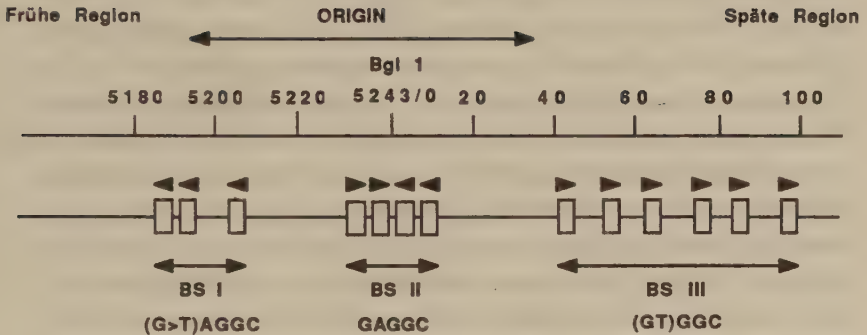


Abb. 4: Bereich des Replikationsursprungs mit den Bindungsstellen für das SV40 T-Antigen

Die BglI-Schnittstelle definiert Anfang und Ende der Nukleotidnumerierung. Darunter sind die drei Bindungsstellen für T-Antigen entsprechend ihrem Vorkommen auf dem SV40-Genom dargestellt. Die Kästchen symbolisieren die für die Bindung notwendigen Consensus-Sequenzen; die darüber liegenden Pfeile geben die Orientierung an.

► = 5'-GAGGC-3'

Erkennungssequenz handelt es sich um ein Pentanukleotid mit der Consensus-Sequenz 5'-GAGGC-3', das mehrmals pro Bindungsstelle, jedoch in unterschiedlicher Anzahl und Orientierung vorkommt (Abb. 4). Die zwei Hauptbindungsstellen für T-Antigen im SV40-Replikationsursprung sind in zahlreichen Arbeiten sehr detailliert untersucht worden (Tjian, 1981; DeLucia et al., 1983; Tegimeyer et al., 1983; Jones and Tjian, 1984). Bindungsstelle I enthält zwei Tandem-Wiederholungen dieser Pentanukleotide, die durch eine Oligo(dT)-Sequenz getrennt sind und einem dritten variierten Pentanukleotid. In Mutationsanalysen der T-Antigen-Bindungsstelle I konnte gezeigt werden, daß die Bindung des T-Antigens an diese Bindungsstelle mit der Autoregulation der "frühen" Genexpression einhergeht (Rio et al., 1980; Hansen et al., 1981; DiMaio and Nathans, 1982). Bindungsstelle II beinhaltet zwei Paare von 5'-GAGGC-3'-Wiederholungen, die als Palindrom angeordnet sind. Auch Bindungsstelle II wurde durch Mutationsanalysen untersucht. Es zeigte sich, daß die T-Antigen-Bindung an dieser Stelle für die virale Replikation eine Startfunktion hat (Shortle et al., 1979; DiMaio and Nathans, 1980; Margolskee and Nathans, 1984).

Dieser kurze Überblick über die T-Antigen-Untersuchungen zeigt, daß die Bindung des T-Antigens an die virale DNA für die Auslösung und Kontrolle mindestens zweier wichtiger regulatorischer Prozesse im Lebenszyklus des SV40-Virus ausschlaggebend ist: die Transkription und die Replikation der viralen DNA.

1.6 Aufgabenstellung

a) Ausgehend von den bekannten Tatsachen, daß lösliches T-Antigen in verschiedenen oligomeren Formen vorkommt, die sich in ihrem Phosphorylierungsgrad voneinander unterscheiden, aber auch in ihrer ATPase- und Helikaseeigenschaft und DNA-Bindungsaktivität unterschiedlich sind (Rigby and Lane, 1983; Stahl et al., 1986), stellt sich die Frage, ob den verschiedenen T-Antigen-Formen auch unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden können.

Weil die spezifische T-Antigen-Bindung an DNA-Sequenzen innerhalb bzw. nahe am SV40-Replikationsursprung die Kontrolle der viralen Transkription und Replikation lenkt (Shortle et al., 1979; DiMaio and Nathans, 1980; Rio et al., 1980; Hansen et al., 1981; DiMaio and Nathans, 1982; Brady et al., 1984; Keller and Alwine, 1984; Markolskee and Nathans, 1984; Brady and Khoury, 1985; Keller and Alwine, 1985) wurde diese biochemische Besonderheit in Bezug auf die Funktionsunterschiede der verschiedenen T-Antigen-Formen von zahlreichen Autoren untersucht. Jedoch haben die Untersuchungen an den verschiedenen oligomeren T-Antigen-Formen auf ihr DNA-Bindungsverhalten zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Einige dieser Widersprüche, die bei der Betrachtung der verschiedenen Publikationen auffallen, lassen sich sicher durch die Verwendung von gefrorenem oder nur partiell gereinigtem T-Antigen im Vergleich zu frisch präparierten, durch Dichtegradientenzentrifugation isolierten T-Antigen-Subklassen erklären.

Eine weitere Möglichkeit, die teilweise völlig unterschiedliche Aussagen zu erklären, war die Verwendung von T-Antigen-Mutanten (D2- bzw. SV80-T-Antigen) im Gegensatz zu Wildtyp-T-Antigen (Tjian, 1978; Shalloway et al., 1980; Tegtmeyer et al., 1981). Untersuchungsergebnisse, die mit dem T-Antigen verwandten D2-Protein erhalten wurden, legten nahe, daß die tetramere Form des T-Antigens die aktive spezifische DNA-Bindungsform dieses Proteins ist; dem gegenüber scheint die monomere Form nur unspezifisch DNA zu binden (McKay, 1981; Myers et al., 1981).

Filterbindungsexperimente mit T-Antigen, die aus transformierten Zellen mit Dichtegradientenzentrifugation bei hoher Ionenstärke aufgetrennt wurden, deuteten darauf hin, daß nur die tetramere (16 S) und die dimer (7-8 S) Form DNA-Bindungsaktivität aufwiesen, nicht jedoch die monomere (5,5 S) Form des T-Antigens (Bradley et al., 1982). Die Sequenzspezifität dieser Bindung wurde jedoch nicht getestet.

Die meisten Untersuchungen erfolgten nach der Methode von McKay (1981). Hierbei wurde zu den Zellextrakten ein Überschuß an unmarkierter, unspezifischer DNA (z.B. aus *E. coli*) zugegeben. Die DNA-Bindung wurde zum Teil bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt und außerdem ein Einfluß der DNA-Bindungszeit nicht genügend berücksichtigt. Auch konnte über Unterschiede in der T-Antigen-Konzentration der einzelnen Subklassen keine definitive Aussage gemacht werden.

Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen, die mit lytischen T-Antigen-Subklassen durchgeführt wurden (isoliert aus Dichtegradientenzentrifugation bzw. Phosphozellulose-Chromatographie), daß neu synthetisiertes 5-7 S T-Antigen wesentlich effizienter an den SV40-Replikationsursprung bindet als die 14-16 S Subklasse (Oren et al., 1980; Dorn et al., 1982; Fanning et al., 1982; Gidoni et al., 1982; Scheidtmann et al., 1984).

Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die Stöchiometrie der T-Antigen-Bindung an die SV40-DNA unterschiedlich ist im Vergleich zu der des D2-T-Antigens: Ein monomeres Wildtyp-T-Antigen bindet jeweils an eine 5'-GAGGC-3'-Sequenz, d. h. drei dieser Moleküle binden an der Bindungsstelle I und jeweils vier an der Bindungsstelle II der SV40-DNA (Mastrangelo et al., 1985). Die tetramere Form des D2-T-Antigens hingegen bindet nur an die Bindungsstelle I (Myers et al., 1981).

Um nun einige dieser widersprüchlichen Aussagen zu klären, sollten drei Subklassen des löslichen lytischen T-Antigens aus frisch präparierten Zellextrakten isoliert und charakterisiert werden. Durch die Verwendung von diesen immungefällten T-Antigen-Subklassen sollte die Bindungsaffinität und spezifische Bindungsaktivität an die SV40-DNA unter verschiedensten experimentellen Bedingungen nochmals untersucht werden.

b) Eine weitere Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit sollte sein, Methoden zur Überexpression des T-Antigens und eine affinitätschromatographische Methode zur Reinigung von T-Antigen in unserem Labor zu etablieren und das T-Antigen möglichst nativ für weitere biologische und biochemische Untersuchungen zur Verfügung zu stellen, wie z. B. für in vitro-Replikationsexperimente, aber auch für weitere DNA-Bindungsstudien und eventuell Kristallisation für Röntgenstrukturanalyse.

2. Material

2.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde mit folgenden Zelllinien gearbeitet:

- | | |
|-------|--|
| TCT | Affennierenzellen, erhalten von Prof. Dr. W. Deppert (Robb and Huebner, 1973)
Medium mit 8% Serum neugeborener Kälber |
| COS-1 | Mit Origin-defektem SV40 transformierte CV-1-Zellen (Affennierenzellen) von Prof. Dr. T. Shenk, Princeton (Gluzman, 1981)
Medium mit 5% fötales Kälberserum |
| HeLa | Zelllinie eines menschlichen Gebärmutterkarzinoms (Gey et al., 1952)
Medium mit 8% Serum neugeborener Kälber |
| 293 | Primäre menschliche Embryonal-Nierenzellen, mit zerkleinerter Adenovirus 5-DNA transformiert (Graham et al., 1977)
Medium mit 5% fötales Kälberserum |

Die Zelllinien wurden in DME-Medium (Gibco/BRL) mit den jeweils genannten Seren bei 37°C/10% CO₂ passagiert und für die Versuche verwendet.

Die Hybridom-Zelllinien Hyb 108 (Gurney et al., 1986) und Hyb 419 (Harlow et al., 1981) wurden in DME-Medium (Gibco/BRL) mit 10% fötalem Kälberserum gehalten und für die Gewinnung der monoklonalen Antikörper Pab 108 und Pab 419 verwendet. Diese erkennen das T-Antigen am N-terminalen Ende im Bereich von 1-82 Aminosäuren.

- | | |
|-----|--|
| Sf9 | Zelllinie aus den Eierstöcken von <u>Spodoptera frugiperda</u> (Familie <u>Noctuidae</u> , Eulenfalter); zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. W. Dörfler, Köln
Medium mit 10% fötales Kälberserum |
|-----|--|

Diese Zellen wurden in TC100-Medium (Gibco/BRL; Gardiner and Stockdale, 1975) bei 28°C gehalten.

2.2 Virusstämme

- SV40 Für die Infektion von TC7-Zellen wurde der SV40-Wildtyp-Virus, Stamm SVS (Takemoto et al., 1966) verwendet.
- Ad5SVRII5 Dieser Virus wurde uns von Y. Gluzman zur Verfügung gestellt und diente zur Infektion der 293-Zellen.
- AcNPV Baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (von Prof. Dr. W. Dörfler). Mit diesem Wildtyp-Virus wurden Sf9-Zellen in Kontrollexperimenten infiziert.
- 373T Der rekombinante Virus wurde uns von R. E. Lanford zur Verfügung gestellt. Dieser Baculovirus enthält eine c-DNA Kopie der T-Antigen-mRNA von SV40 (Lanford, 1988).

2.3 Plasmide

- pBR 322 Plasmidkonstrukt (Bolivar et al., 1977).
- pAT 153 Derivat von pBR 322, das durch Deletion der HaeIII B- und G-Fragmente (1646-2351) keine "poison-sequence" besitzt (Twigg and Sherratt, 1980).
- pSV-wt Das Plasmid enthält die komplette SV40-Nukleotid-Sequenz, kloniert in die BamHI-Schnittstelle des Plasmids pAT 153 (Fanning et al., 1982).
- pON-wt Plasmid mit einem chemisch synthetisierten, 19 bp langen Oligonukleotid, das die SV40-T-Antigen-Bindungsstelle I (Nukleotide: 5191-5209, BBB-Numerierung, Tooze, 1981) enthält, kloniert in die BamHI-Schnittstelle von pAT 153 (Ryder et al., 1985).

2.4 Seren und Medien

Firma Biochrom KG, Berlin:

Fötales Kälberserum, Serum neugeborener Kälber

Firma Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Serum neugeborener Kälber

Firma Gibco/BRL GmbH, Eggenstein:

DME, fötales Kälberserum

2.5 Enzyme

Restriktionsenzyme folgender Firmen wurden verwendet:

New England Biolabs, Schwalbach; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; Gibco/BRL GmbH, Eggenstein; Pharmacia, Freiburg; Renner GmbH, Dannstadt

Andere Enzyme

Firma Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

Alkalische Phosphatase, β -Galaktosidase

Firma New England Biolabs, Schwalbach

T4-Polynukleotidkinase

2.6 Chemikalien und weitere Materialien

Firma Amersham und Buchler, Braunschweig

γ - ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol), Biotin-markiertes Mausimmunglobulin, ^{32}P als Orthophosphat (1 mCi/ml), ^{35}S -Methionin (800 Ci/mmol), Biotin-Streptavidin-System, Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex

Firma Baker Chemicals, Deventer, Holland

Lipoluma, Lumasolve, Glycerin

Firma Beckman Instruments GmbH, München

Polyallomer Zentrifugenröhrchen 13 x 51 mm

Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Protein Assay nach Bradford (Farbstoff-Konzentrat), Bovine Plasma Gamma Globulin, verschiedene Econo-Säulen (Chromatography Columns)

Firma Calbiochem GmbH, Frankfurt

Pronase

Firma Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg

Original Eppendorf Reaktionsgefäße 3810, 1.5 ml

Firma Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid, 3,3'-Dimethoxybenzidin
(o-Dianisidin), Wasserstoffperoxid

Firma Greiner und Söhne GmbH und Co. KG, Frickenhausen

Gewebekulturschalen und -flaschen, diverse Kunststoffröhrchen

Firma Glücksklee, Hamburg

Instant Magermilchpulver

Firma Kodak Limited

Röntgenfilme X-Omat S und XAR-5

Firma Merck AG, Darmstadt

Ammoniak, Borsäure, 1-Butanol, Chloroform, Diethylether, Dinatriumhydrogenphosphat, Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure (EDTA), Ethanol, Essigsäure, Formaldehyd, Glucose, Glycerin, Glycin, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kalziumazetat, Kalziumchlorid, Kobaltchlorid, Kupferchlorid, Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Manganchlorid, β -Mercaptoethanol, Methanol, Natriumazetat, Natriumazid, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumzitrat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylhydrogensulfat (SDS), Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Natriummolybdat, Natriumtetraborat, Nickelchlorid, Phenol, Salzsäure 25%, Saccharose, Silbernitrat, Triethanolamin, Triethylamin, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Zinkchlorid

Firma Nunc GmbH, Wiesbaden

250 ml Gewebekulturflaschen (80 cm²), Multischalen 4er well, Kryoröhrchen (1.8 ml)

Firma Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg

Sepharose CL-4B, Protein-A-Sepharose CL-4B

Firma Promega Biotec, Heidelberg

ProtoBlot Immunoscreening System

Firma Schleicher und Schuell, Dassel

Nitrozellulose BA-85, 3MM Whatman-Papier

Firma Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg

Acrylamid, Ammoniumperoxidisulfat (APS), Ampizillin, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP), Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ethidiumbromid, Hämoglobin, Kanamycin, Lysozym, Nitro blue tetrazolium (NBT), N,N'-bis-methyl-acrylamid, Penizillin, RNase, Streptomycin, N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED), Triton X-100, Trypsin

Firma Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Agarose, Dimethylpimelimidatdihydrochlorid, Dithiothreitol (DTT), Glykogen, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), o-Nitrophenyl- β -Galaktosid, p-Nitrophenylphosphat-Tabletten, Nonidet P-40 (NP-40), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure (PIPES), Prestained SDS Molecular Weight Marker, Rinderserumalbumin (BSA), Spermidin, Triethanolamin, Tween 20

Firma Tetanal Photowerk GmbH & Co., Norderstedt

Abschwächer

3. Methoden

3.1 Zellkultivierung

Die verschiedenen Zelllinien wurden auf Kollagen-beschichteten Gewebekulturschalen ($\varnothing$ 145 mm) bzw. in Gewebekulturflaschen (250 ml, 80 cm² bzw. 50 ml, 25 cm²) in Einschichtkultur gezüchtet (Säugerzellen bei 37°C und 10% CO₂; Insektenzellen bei 28°C in Flaschen ohne zusätzliches CO₂). Als Nährlösung diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DME, Dulbecco and Freeman, 1959). Für die Insektenzellen (St9) wurde TC100 (Gibco/BRL; Gardiner and Stockdale, 1975) verwendet. Der Zusatz von Seren erfolgte wie beschrieben (siehe Material).

Je nach Zellwachstum und Teilungsrate wurden die Zellen alle 2-4 Tage in neue Gewebekulturgefäße überführt. Dazu wurden die Säugerzellen für 3-5 min bis zum Ablösen mit Trypsinlösung bei 37°C inkubiert. Die Insektenzellen wurden durch vorsichtiges Spülen vom Plattenboden abgelöst. Nach Überführen der Zellen in Zellkulturröhrchen wurden diese sedimentiert (ca. 1000 x g) und in frischem Kulturmedium in Verdünnungen von 1:3 bis 1:5 auf neue Gewebekulturgefäße verteilt.

Trypsinlösung:

8.0 g NaCl

0.2 g KCl

0.2 g KH₂PO₄

1.25 g Na₂HPO₄

1.25 g Trypsin

1.25 g EDTA ad 800 ml H₂O

0.1 g CaCl₂x2H₂O

0.1 g MgSO₄x7H₂O ad 200 ml H₂O

Beide Lösungen wurden gemischt und sterilfiltriert.

DME (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco/BRL) mit zusätzlich:

40 mg/l Penizillin

80 mg/l Streptomycin

100 mg/l Kanamycin

44.6 mM NaHCO₃

3.2 Aufzucht der Viren

a) SV40

Zur Vermehrung von SV40 wurden semikonfluente TC7-Zellen (ca. 2×10^6 Zellen pro $\varnothing$ 145 mm Gewebekulturschale) mit 2 ml SV40 (1-5 pfu/Zelle) enthaltendem Medium infiziert. Nach einer zweistündigen Adsorptionszeit bei 37°C wurde mit frischem Medium auf ein Endvolumen von ca. 25-30 ml aufgefüllt. Nach 8-10 Tagen bei 37°C waren alle Zellen lysiert. Das SV40-enhaltende Medium wurde in sterile Flaschen überführt und, wie in Baumgartner et al. (1979) beschrieben, behandelt. Die Virustiterbestimmung erfolgte durch die Immunperoxidase-Färbung (3.5).

b) Ad5SVRII5

100 µl eines Inokulums wurden mit 2 ml Medium gemischt und auf eine, mit 293-Zellen semikonfluent bewachsene, Gewebekulturflasche (80 cm²) gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C. Der Mediumüberstand wurde entfernt und 20 ml neues Medium auf die Zellen gegeben. Nach ungefähr 7 Tagen waren nahezu alle Zellen lysiert. Der Überstand wurde abzentrifugiert (15 min, 3000 x g) und sterilfiltriert (Porengröße 0.22 µm). Dieser Vorgang wurde unter Verwendung des jeweils neu erhaltenen Virusüberstandes zwei- bis dreimal wiederholt, um einen guten Virustiter zu erreichen. Die Virustiterbestimmung erfolgte wie beschrieben. Die Virusstocklösung wurde portionsweise bei -70°C aufbewahrt.

c) 373T-Baculovirus

Von kleinen Gewebekulturflaschen (25 cm^2 , $2,5 \times 10^6$ Zellen), die semi-konfluent mit Sf9-Zellen bewachsen waren, wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden mit 373T ($0,5\text{--}1,0\text{ pfu/Zelle}$) für ca. 2 h bei 28°C infiziert; der Überstand wieder entfernt und jede Flasche (25 cm^2) mit 8 ml Medium aufgefüllt. Nach 5-7 Tagen (Kontrolle durch mikroskopische Beobachtung; Abb. 5) wurde das Medium abzentrifugiert (15 min, $3000 \times g$) und der Überstand sterilfiltriert (Porengröße $0,22\text{ }\mu\text{m}$). Zum Aufbau einer Virusstocklösung wurde dieser Vorgang 2x mit dem neu erhaltenen Virusüberstand wiederholt. Die Bestimmung des tatsächlichen 373T-Virustiters ergab 10^8 pfu/ml und wurde durch einen Plaque-Test bestimmt (pers. Mitteilung von I. Moarefi; Summers and Smith, 1987). Die verwendete Virusmenge für Infektionen zur T-Antigen-Gewinnung lag bei ca. 5 pfu/Zelle . Die Virusstocklösung konnte bei 4°C mehrere Monate lang aufbewahrt werden.

3.3 Infektion von Zellen

a) TC7-Zellen

Semikonfluente TC7-Zellen (2×10^6 Zellen pro Platte $\varnothing 145\text{ mm}$) wurden mit $5\text{--}10\text{ pfu/Zelle}$ infiziert. Nach zwei Stunden bei 37°C wurde auf ca. 25 ml Medium aufgefüllt. Die Dauer der Infektion ist bei den einzelnen Experimenten angegeben.

³⁵S-Methionin-Markierung: 2 h vor Infektionsende erhielten die Zellen Methionin- und Serum-freies Medium. Die Zellen wurden dann mit ³⁵S-Methionin ($500\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ pro Platte) in Methionin-freiem Medium markiert.

³²PO₄-Markierung: Die Zellen wurden 1 h vor Infektionsende in Phosphat- und Serum-freiem Medium inkubiert und dann für 2 h mit ³²P als Orthophosphat ($100\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ Platte) in Phosphat-freiem Medium markiert.

Am Ende der Markierungszeiten wurden die Zellen wie üblich behandelt.

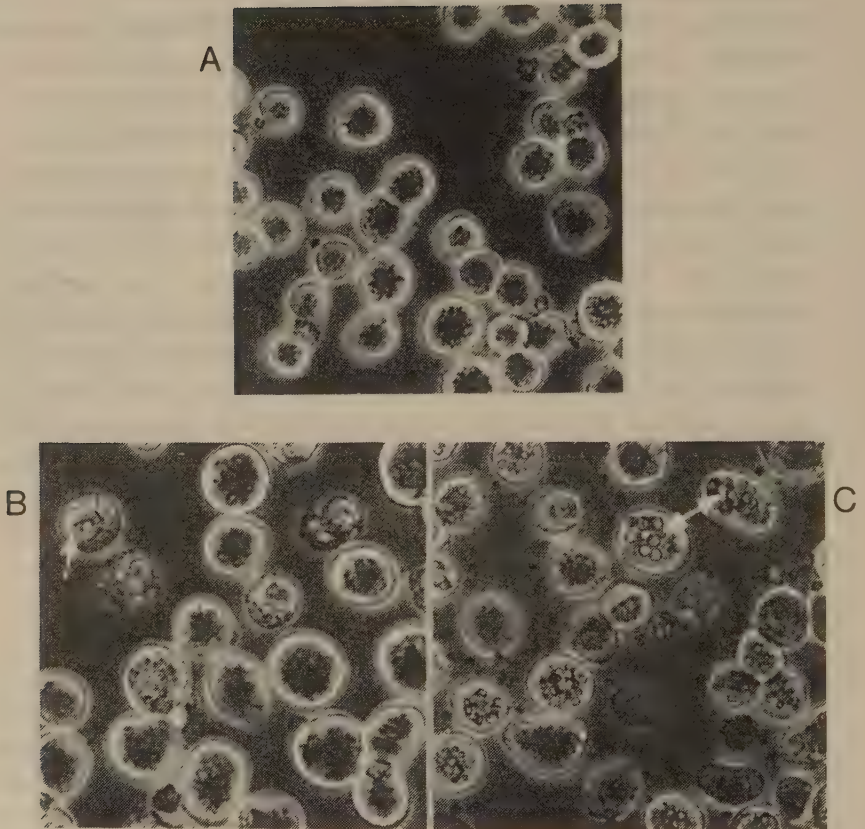


Abb. 5: Darstellung von uninfizierten und infizierten Sf9-Zellen in Dunkelfeldmikroskopie (2560fache Vergrößerung)

A. Uninfizierte Sf9-Zellen

B. Die Zellen sind mit dem rekombinanten 373T-Baculovirus infiziert. Nach drei Tagen stellt sich der Habitus vergrößert dar; bei einigen Zellen ist der ebenfalls stark vergrößerte Zellkern sichtbar (Pfeil). In diesen Zellen werden keine Polyhedrin-Kristalle gebildet. Einige Zellen sind bereits abgestorben.

C. Zur Kontrolle des Infektionsverlaufs wurden Zellen mit AcNPV-Baculovirus (Wildtyp) infiziert. 3 Tage nach Infektion sind hier deutlich die Polyhedrin-Kristalle als kleine Kügelchen in den Zellen sichtbar (Pfeil).

b) 293-Zellen

Semikonfluent gewachsene 293-Zellen ($6-8 \times 10^6$ Zellen pro Flasche, 80 cm^2) wurden mit Ad5SVRII5-Virusüberstand (2-5 pfu/Zelle) für 2 h bei 37°C infiziert. Der Überstand wurde entfernt und 20 ml Medium pro Zellkulturflasche zugegeben. Die Infektionszeit betrug 48 h, bevor die Zellen geerntet wurden.

c) Sf9-Zellen

Von semikonfluent mit Sf9-Zellen bewachsenen Gewebekulturflaschen (80 cm^2) wurde das Medium entfernt und die Zellen (1×10^7 Zellen pro Flasche) mit 2 ml 373T-Virus aus der Virusstocklösung für 2 h bei 28°C infiziert. Der Virus-haltige Überstand wurde entfernt und 20 ml Medium pro Flasche zugesetzt. Die Gesamtdauer der Infektion betrug 40 h, bevor die Zellen geerntet wurden.

Als Kontrolle für einen erfolgreichen Infektionsverlauf wurde parallel eine Zellkulturflasche mit 2 ml AcNPV analog infiziert. Zwei Tage nach Infektion sind in den Sf9-Zellen, verursacht durch den Wildtyp-Virus, Polyhedrin-Kristalle zu beobachten (Abb. 5A-C).

3.4 Bestimmung von Virustitern

Zellen (COS-1, HeLa, TC7) wurden auf Multischalen (4er well) mit einer Dichte von ca. 30000 Zellen/"well" ausgesät. Verschiedene Virusverdünnungen (SV40, Ad5SVRII5) in Volumina von 100-200 μl /"well" wurden auf die Zellen appliziert und 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die Virusverdünnungen wurden dann entfernt und 500 μl Medium auf die Zellen gegeben. Nach 18-20 h wurde der jeweilige Virustiter durch die Immunperoxidase-Färbung des T-Antigens ermittelt (3.5). Die COS-1-Zellen dienten dabei als Kontrolle für die Färbung, da diese transformierte Zelllinie permanent T-Antigen exprimiert.

3.5 Anfärben von Zellen durch die Immunperoxidase-Färbung

Die Immunperoxidase-Färbung diente dem Nachweis für die Expression von T-Antigen in infizierten bzw. transformierten Zellen.

Zunächst wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, dann 90 sec mit einer Aceton/Ethanol-Mischung (1:1) fixiert, erneut 2x mit PBS gewaschen und dann mit PBS+10% FCS für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dann über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen Antikörper Pab 108 (5 µg Pab 108/ml PBS+10% FCS) inkubiert, 5x mit PBS gewaschen und erneut für 5 min in PBS+10% FCS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Anti-Maus-Antikörper aus Kaninchen (1:50 in PBS+10% FCS) für 2 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut 5x mit PBS gewaschen, 2 min mit PBS+10% FCS inkubiert und vor der Zugabe des Substrates noch 2x mit PBS gewaschen.

PBS-Puffer:

8.76 g NaCl

0.37 g KCl

0.275 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

4.513 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml pH 7.35

Als Substrat für die Peroxidase diente eine 3,3'-Dimethoxybenzidin (o-Dianisidin), gesättigte Ethanollösung (100% Ethanol) wurde 1:100 mit PBS verdünnt und 100 ml dieser Lösung mit 17 µl 30% Wasserstoffperoxid versetzt. Je 300 µl dieser Lösung wurden auf die Zellen gegeben und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Das Vorhandensein von T-Antigen war an einer kräftigen rotbraunen Färbung der Zellkerne im Lichtmikroskop zu erkennen.

3.6 Enzymatische Reaktionen mit DNA

3.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Spaltung von DNA (5 µg) mit Restriktionsenzymen wurde, wie von den Herstellern der jeweiligen Enzyme angegeben, verfahren und die empfohlenen Puffer verwendet. Der Verdau wurde durch Inkubation bei 65°C für 10 min und anschließender Ethanolfällung beendet. Die DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) aufgenommen.

3.6.2 Präparation der alkalischen Phosphatase für die DNA-Dephosphorylierungsreaktion

10 µl (- 40 U) alkalische Phosphatase(AP)-Suspension in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wurden 1 min bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 500 µl Puffer (Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM MgCl_2 ; 0.1 mM ZnCl_2) resuspendiert und anschließend für 2 h bei RT gegen denselben Puffer dialysiert. Die Enzym-Endkonzentration lag bei 80 U/ml. Die so vorbereitete AP wurde bei 4°C gelagert und konnte ca. einen Monat lang verwendet werden.

3.6.3 Radioaktive Markierung der 5'-Enden nach DNA-Spaltung

a) Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Die Abspaltung der Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA-Restriktionsfragmente erfolgte mittels AP. Dazu wurden 5 µg DNA in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Um für die AP die notwendigen Salzbedingungen zu schaffen, wurde zum Reaktionsansatz 5 µl 1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 µl 0.1 M ZnCl_2 und 0.5 µl 1 M MgCl_2 hinzugefügt. Nach Zugabe von 10 µl der vorbehandelten AP (- 0.8 U) wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C für 10 min und Zugabe von 5 µl 0.5 M EDTA, pH 8.0 beendet. Durch Phenolextraktion (Maniatis, 1982) wurde die AP entfernt, die DNA mit Ethanol präzipitiert, getrocknet und das DNA-Pellet in 5 µl TE-Puffer aufgenommen.

b) 5'-Endmarkierung der dephosphorylierten DNA mit T4-Polynukleotid-Kinase

Zu der in 5 μ l TE-Puffer gelösten DNA wurden 35 μ l Lösung 1 zugegeben und 5 min bei 60°C inkubiert und nach Abkühlen 5 μ l Lösung 2 zugefügt. Dieser Ansatz wurde dann mit 4 units T4-Polynukleotid-Kinase und 5 μ l γ -³²P-ATP (10 mCi/ml) versetzt, gründlich gemischt und 45 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde danach mit Ethanol präzipitiert und durch Agarosegelelektrophorese und Autoradiographie die Endmarkierung überprüft.

Lösung 1:

20 mM Tris-HCl, pH 9.5
1 mM Spermidin
0.05 mM EDTA

Lösung 2:

500 mM Tris-HCl, pH 9.5
110 mM MgCl₂
50 mM DTT
50% Glycerin

3.7 Isolierung der T-Antigen-Subklassen

3.7.1 Herstellung von T-Antigen-enthaltendem Zellextrakt für die Dichtegradientenzentrifugation

Von großen Zellkulturplatten ($\varnothing$ 145 mm, 2-3 x 10⁶ Zellen/Platte) wurde das Medium entfernt und die Zellen 4x mit kaltem Hanks-Puffer (4°C; Hanks and Wallace, 1949) gewaschen.

Hanks-Puffer:

150 mM NaCl
5 mM KCl
0.5 mM MgCl₂
0.4 mM MgSO₄
1.3 mM CaCl₂
0.34 mM Na₂HPO₄
5 mM Glucose
0.44 mM KH₂PO₄
0.42 mM NaHCO₃

Die Zellen jeder Platte wurden abgeschabt und in Eppendorfgefäßen durch kurze Zentrifugation (1 min, 12 000 x g) sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 100 µl Lysis-Puffer aufgenommen.

Lysis-Puffer:

50 mM Tris-HCl pH 9.0

120 mM NaCl

0.5% NP-40

Anschließend wurden die resuspendierten Zellen auf Eis für 30 min inkubiert und die Zellfragmente abzentrifugiert (2 min, 12000 x g). Die proteinhaltigen Überstände wurden vereinigt. Je 200 µl dieses Zellextraktes wurden dann vorsichtig auf die Oberfläche eines Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen.

3.7.2 Herstellung der Saccharose-Dichtegradienten

Auf dem Boden eines Beckman-Polyallomer-Röhrchens wurden 200 µl der 60%igen Saccharose-Lösung vorgelegt und mit 4.4 ml eines kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (30-15%) überschichtet.

Saccharose-Dichtegradienten-Lösungen:

10 mM HEPES pH 7.8

1 mM DTT

1 mM PMSF

0.5 mM $MgCl_2$

150 mM KCl

+ 15% bzw. 30% bzw. 60% Saccharose

3.7.3 Dichtegradientenzentrifugation der Zellextrakte

Um die Subklassen des T-Antigens der Größe nach aufzutrennen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (Dorn et al., 1982). Pro Gradient wurden 200 μ l des Zellextraktes (- 2 Kulturplatten) aufgetragen. Die Zentrifugation wurde für 21.5 h bei 4°C und 45 000 rpm in einem SW55-Ti Rotor (Beckman) durchgeführt.

Durch Anstechen des Gradientenröhrchenbodens wurden Fraktionen von ca. 100 μ l gesammelt. Parallel dazu wurde ein Markergradient mitzentrifugiert, der Proteine mit bekannten Sedimentationskoeffizienten enthielt.

3.7.4 Nachweis der Markerproteine

a) β -Galaktosidase (Sedimentationskoeffizient 16 S)

0.5 μ l β -Galaktosidase-Lösung (Boehringer Mannheim) wurden zu 200 μ l Gradienten-Lösung ohne Saccharose gegeben.

Nachweis der β -Galaktosidase (Miller, 1972): Zu den β -Galaktosidase-enthaltenden Proben wurden je 200 μ l Z-Puffer, der 4 mg/ml o-Nitrophenyl-D-Galaktopyranosid enthielt, zugegeben. Nach Inkubation von 10 min bei 28°C wurde die enzymatische Farbreaktion durch Zusatz von 0.5 ml 1 M Na_2CO_3 gestoppt und die Absorption bei 420 nm in einem Beckman Spektralphotometer DU40 bestimmt.

Z-Puffer (pH 7.0):

- 60 mM Na_2HPO_4
- 40 mM NaH_2PO_4
- 10 mM KCl
- 1 mM MgSO_4
- 50 mM β -Mercaptoethanol

b) Alkalische Phosphatase (Sedimentationskoeffizient 6.3)

1 μ l einer 1:100 verdünnten AP-Lösung (Boehringer Mannheim) wurden zu der gleichen 200 μ l Gradienten-Lösung gegeben.

Nachweis der Alkalischen Phosphatase (Lazdunski and Lazdunski, 1966):

In einer Lösung von 2 g Triethanolamin in 20 ml H₂O (pH 9.8) wurden je vier p-Nitrophenylphosphat-Tabletten gelöst. Zu je 25 μ l der AP-enhaltenden Proben wurden 200 μ l dieser Lösung zugegeben. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 25 μ l 4M NaOH gestoppt und die Absorption bei 400 nm in einem Spektralphotometer gemessen.

c) Hämoglobin (Sedimentationskoeffizient 4.3)

Einige mg Hämoglobin wurden zu der 200 μ l Gradienten-Lösung zugegeben.

Nachweis des Hämoglobins: Die braune Farbe des Hämoglobins war nach der Dichtegradientenzentrifugation in den Fraktionen gut erkennbar. In Zweifelsfällen erfolgte eine Absorptionsbestimmung bei 540 nm.

3.6 "Target-bound Assay" (Hinzpeter et al., 1986)

Mit diesem modifizierten McKay-Test (McKay, 1981) wurden immunpräzipitierte T-Antigen-Subklassen auf ihre Fähigkeit, ein den Replikationsursprung enthaltendes SV40-DNA-Fragment spezifisch zu binden, überprüft (Huber et al., 1985; Hinzpeter et al., 1986).

Je 100 μ l T-Antigen-Subklassen-enhaltende Fraktionen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit 100 μ l Bindungspuffer A gemischt und mit 5 μ g gereinigtem monoklonalen Antikörper Pab 108 60 min bei 0°C inkubiert. Nach Zugabe von 35 μ l Staphylococcus aureus-Suspension

(Kessler, 1975) wurde erneut für 30 min bei 0°C inkubiert. Danach wurden die Immunkomplexe abzentrifugiert (3 min, 12000 x g) und 4x mit NET-Puffer gewaschen, um alle Proteine, die nicht an Antikörperkomplexe gebunden sind, zu entfernen (Fanning et al., 1982).

Bindungspuffer A:

10 mM HEPES pH 7.8
5 mM KCl
1 mM DTT
0.5 mM MgCl₂
1 mM PMSF

Bindungspuffer B:

10 mM HEPES pH 7.8
80 mM KCl
1 mM DTT
0.5 mM MgCl₂
1 mM PMSF

NET-Puffer:

50 mM Tris-HCl pH 7.5
150 mM NaCl
5 mM EDTA
0.5% NP-40

Bindungspuffer B diente zur Aufnahme der Proben nach der Immunpräzipitation bzw. zur Konzentrationseinstellung von T-Antigen-Subklassen.

Nach diesen Waschschritten wurde das Immunkomplex-Präzipitat in 80 µl Bindungspuffer B aufgenommen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen von DNA an die Bakterien wurden zu jeder Probe 10 µl Glykogen (0.2 mg/ml) und 20 µl Rinderserumalbumin (1 mg/ml) zugegeben und für 30 min bei 0°C inkubiert.

Danach wurden, soweit nicht anders angegeben, 0.25 µg mit Restriktionsenzymen geschnittene und 5'-endmarkierte DNA im Überschuß zu T-Antigen zugegeben. Dieser DNA-Protein-Bindungsansatz wurde für 2 h bei 0°C inkubiert, die Immunkomplexe 3x mit NET-Puffer gewaschen und in 20 µl Probenpuffer resuspendiert.

Probenpuffer:

125 mM Tris-HCl pH 8.3

20% Glycerin

4% SDS

10% β -Mercaptoethanol

0.001% Bromphenolblau

Um die spezifisch gebundene DNA aus den Immunkomplexen abzutrennen, wurden die Ansätze für 10 min bei 65°C inkubiert, 5 min abzentrifugiert (12000 x g) und der Überstand auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Als Marker diente 12.5 ng der jeweils im Experiment verwendeten 5'-radioaktiv markierten Plasmid-DNA (1 μ l in 20 μ l NET-Puffer und 20 μ l Probenpuffer). Nach Elektrophorese wurden die Gele für 30 min in Ethanol (95%) fixiert, bei 60°C getrocknet und bei -70°C autoradiographiert.

3.9 Präparation von *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus. Stamm Cowan I. wurde nach der Methode von Kessler (1975) kultiviert und in 1 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Bakteriensuspension aufgetaut, abzentrifugiert und in 900 μ l NET-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation für 15 min bei RT wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert, 4x mit NET-Puffer gewaschen und wieder in 900 μ l NET-Puffer resuspendiert.

3.10 Reinigung von monoklonalen Antikörpern (Ey et al. 1978)

Die Hybridomzellen Hyb 108 (Gurney et al., 1986) wurden unter Zellkulturbedingungen solange gehalten, bis die Zellen abgestorben waren. Die Zellfragmente wurden im GSA-Rotor (Sorvall) bei 8000 rpm für 15 min abzentrifugiert und zum Überstand (ca. 500 ml) 0.02% Natriumazid und 1 g Protein-A-Sepharose gegeben. Diese Suspension wurde dann über Nacht bei RT leicht geschüttelt. Die Sepharose wurde anschließend

in eine Säule gepackt und mit ca. 30 Säulenvolumina NET-Puffer gewaschen, bis das Eluat bei 280 nm keine Extinktion mehr aufwies. Die monoklonalen Antikörper wurden mit 0.25 M Glycin-HCl Puffer pH 2.4 eluiert, in 1 ml Fraktionen gesammelt, diese sofort mit Tris-Pulver neutralisiert und die Extinktion bei 280 nm und 260 nm bestimmt. Die IgG-enhaltenden Proben wurden vereinigt und über Nacht gegen Borat-Puffer dialysiert.

Borat-Puffer:

0.1 M Borsäure
0.03 M Na-tetraborat
0.1 M NaCl

Die Extinktion wurde nach der Dialyse erneut bestimmt und die Proteinkonzentration mit dem Borat-Puffer auf 1 mg/ml eingestellt. Die Antikörper wurden in 200 µl Portionen aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

3.11 Isolierung der SV40-DNA nach Hirt (1967)

Nach Entfernen des Mediums wurden die SV40-infizierten TC7-Zellen 4x mit kaltem Hanks-Puffer (4°C) gewaschen und anschließend pro Platte mit 5 ml TE-Puffer abgeschabt. Der Zellsuspension wurde SDS zu einer Endkonzentration von 10% SDS zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von 0.3 ml Pronase (Calbiochem, 5 mg/ml TE; 2 h bei 37°C vorbehandelt) und Inkubation für 30 min bei 37°C wurden 1.6 ml 5 M NaCl zugegeben, vorsichtig geschüttelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (1 h, 26900 x g) wurde das Sediment (zelluläre DNA) verworfen, der Überstand mit dem 3fachen Volumen Ethanol (100%) gemischt und über Nacht bei -20°C die SV40-DNA gefällt. Diese wurde anschließend präzipitiert (15 min, 12000 x g) und 3x mit Ethanol (100%) gewaschen. Daraufhin wurde die SV40-DNA in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und die Reinheit der Präparation durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

Wenn noch RNA auf dem Gel sichtbar war, wurden die SV40-DNA-Proben mit je 2 μ l RNase (200 μ g/ml) für 1 h bei 37°C inkubiert und erst danach in den Versuchen verwendet.

3.12 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zur Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten. Es wurden dazu horizontale Agarosegele (20 x 15 x 0.5 cm) bzw. Agaroseminigele (10 x 7 x 0.5 cm, Hoefer-Mini HE33) verwendet. Die Agarosekonzentration betrug je nach Experiment 0.8-2%, TBE-Puffer diente als Laufpuffer.

TBE-Puffer:

89 mM Tris

89 mM Borsäure

2 mM EDTA

Die Laufzeit der großen Gele betrug 12-16 h bei ca. 40 mA (40-50 V), die der Minigele ca. 1 h bei 80 mA (120 V). Zur Kontrolle der Elektrophoresestrecke war den Proben Bromphenolblau als Farbmarker zugesetzt.

Zur Visualisierung der DNA wurden die Gele für 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (20 mg/l) angefärbt, dann 15 min mit H₂O gespült und über UV-Licht (254 nm) mit einer Polaroid-Kamera photographiert. Zur Autoradiographie wurden die Agarosegele 30 min in Ethanol (95%) fixiert und bei 60°C getrocknet. Die Exponierung erfolgte bei -70°C gegen Kodak-Röntgenfilme.

3.13 Messung der Radioaktivität in Gelstücken

Durch Vergleich der Autoradiographie mit dem getrockneten Polyacrylamid- oder Agarosegel konnten die radioaktiven Protein- oder DNA-Banden lokalisiert und dann aus den getrockneten Gelen ausgeschnitten werden. Die Gelstückchen wurden in ein Szintillationsgefäß gegeben und in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (10 Teile Lipoluma, 1 Teil Lumasolve, 0,2 Teile H₂O) über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf 4°C wurde die Radioaktivität für 5 min gezählt.

3.14 Dot-Blot-Analysen zur relativen Mengenbestimmung der T-Antigen-Subklassen

Alle Dot-Blot-Analysen erfolgten auf Nitrozellulose BA-85 (Schleicher und Schuell); die densitometrischen Auswertungen wurden durch eine Reflexionsmessung mit einem Elscript 400 (Hirschmann Gerätebau, Unterhaching) ermittelt.

3.14.1 Bestimmung auf der Basis von ¹²⁵I

Je 5 µl der Subklassen wurden auf Nitrozellulose aufgetragen. Nach mehrfachem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation für 1 h mit 20 µg Pab 108 (1 mg/ml) bei RT. Nach weiterem Waschen wurde der Blot im Labor von Frau M. Westphal (Abteilung Prof. Dr. Gerisch, Martinsried) mit ¹²⁵I-markiertem Anti-Maus-IgG behandelt. Nach Autoradiographie erfolgte die densitometrische Auswertung des Films.

3.14.2 Biotin-Streptavidin-System (Amersham und Buchler)

Die mit PBS angefeuchtete Nitrozellulose wurde in einem Bio-Dot-Apparat (Bio-Rad) eingelegt. In die Probenlöcher wurden entweder 100 µl Bindungspuffer B oder PBS vorgelegt, um dann in ansteigenden Volumina 1-30 µl der jeweiligen T-Antigen-Subklassen hineinzupipettieren.

Durch diese Verdünnung der Proben mit dem Puffer erreichte man eine optimale Verteilung der Proteine auf der Membran. Die Proben ließ man entweder langsam durch die Membran sickern oder saugte sie mit einem leichten Vakuum auf die Nitrozellulose.

Nach Entnahme aus der Apparatur und Trocknung der Membran wurde diese für 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C mit PBS, das 1% Rinderserumalbumin (BSA) oder 3% Milchpulver enthielt, zur Absättigung unbesetzter Bindungsstellen inkubiert. Vier Waschgänge von je 5 min mit PBS/0.1% Tween 20 schlossen sich an, bevor 30 ml PBS/1% BSA mit 20 µg Pab 108 zugegeben wurden. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT unter Schütteln, danach wurde 4x 5 min gewaschen (s. o.). 50 µl eines Biotin-konjugierten Schaf-anti-Maus-Antikörpers (Konzentration von Amersham nicht angegeben) in 30 ml PBS/1% BSA wurde für 1 h bei RT zur Nitrozellulose gegeben und danach durch viermaliges Waschen wieder entfernt. Nach Zugabe von 50 µl Biotin-Streptavidin-Komplex (Konzentration unbekannt) in 30 ml PBS/1% BSA wurde die Membran erneut für 1 h bei RT inkubiert und anschließend gründlich gewaschen.

Das Substrat für die Farbreaktion setzte, sich wie folgt zusammen:

25 mg Diaminobenzidin in 50 ml PBS

30 µl H₂O₂ (unmittelbar vor Gebrauch zusetzen)

15 mg NiCl₂

Das Nickelchlorid diente als Verstärker für die Farbreaktion (Adams, 1981). Bei Verwendung von Kobaltchlorid als Verstärker war eine sehr intensive Färbung des Hintergrundes festzustellen.

Die Nitrozellulose wurde im Dunkeln für ca. 20 min bei RT inkubiert, dann gewaschen und getrocknet.

Diese Methode ist sehr zeitraubend. Der Vorteil aber zeigt sich in einer hohen Empfindlichkeit durch die Nickelchlorid-Verstärkung. Außerdem weist eine Titration der T-Antigen-Subklassen mit ansteigenden Volumina einen linearen Verlauf der Färbung auf (Abb. 9B).

3.14.3 ProtoBlot Immunoscreening System (Promega Biotec)

Die T-Antigen-Proben wurden, wie in 3.14.2 beschrieben, auf die Nitrozellulose aufgetragen. Um den Verlauf einer affinitätschromatographischen Reinigung von T-Antigen zu kontrollieren, wurde pro Probenloch der Apparatur nur jeweils 1 µl aus den verschiedenen Proteinfraktionen aufgetragen. Die Detektion erfolgte analog der Beschreibung unter 3.18. Als erster Antikörper diente wahlweise Pab 108 bzw. Pab 419.

3.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)

Verwendet wurden Polyacrylamid-Plattengele von 9 cm Länge, 14 cm Breite und 1.5 mm Dicke. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 12.5% Polyacrylamid-Gel.

Trenngel:

10 ml Lösung A (30% Acrylamid, 0.8% N,N'-Bis-methyl-acrylamid)

6 ml Lösung B (1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS)

7.75 ml dest. H₂O

240 µl 10% Ammoniumperoxidisulfat (APS)

10 µl N.N.N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin (TEMED)

Das Trenngel wurde mit 2 cm 5%igem Sammelgel überschichtet.

Sammelgel:

1.65 ml Lösung A

2.5 ml Lösung C (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS)

5.85 ml dest. H₂O

50 µl 10% APS

10 µl TEMED

Als Laufpuffer diente 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM Glycin und 1% SDS. Die Elektrophorese erfolgte für 3-4 h bei 50 mA. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Probenpuffer gemischt, 10 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen.

Als Markergemisch diente Prestained SDS Molecular Weight Marker (Sigma).

Laemmli-Probenpuffer (pH 8.3):

120 mM Tris-HCl pH 8.0

4% SDS

10% β -Mercaptoethanol

40% Glycerin

0.002% Bromphenolblau

3.16 Anfärbung der Polyacrylamid-Gele

3.16.1 Coomassie-Färbung (Weber and Osborn, 1969)

Das Proteingel wurde für mindestens 2 h in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung gewaschen, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Gele konnten in H₂O einige Wochen aufbewahrt und bei 80°C getrocknet werden.

Coomassie-Färbelösung:

40% Methanol

10% Essigsäure

0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250

Entfärbelösung:

40% Methanol

10% Essigsäure

3.16.2 Silberfärbung nach Wray et al. (1981)

Zuerst wurde das Proteingel für mindestens 2 h in 50% Methanol fixiert, daraufhin 15 min in Lösung C gefärbt, 10 min mit H₂O gewaschen und dann in Lösung D für 5-20 min entwickelt. Die Lösungen müssen immer frisch angesetzt werden.

Lösung A: 0.8 g AgNO₃ in 4 ml H₂O

Lösung B: 2l ml 0.36% NaOH + 1.4 ml 25% Ammoniak-Lösung

Lösung C: Lösung A wurde tropfenweise zu Lösung B gegeben und dann auf 100 ml mit H₂O aufgefüllt

Lösung D: 2.5 ml 1% Zitronensäure, 0.5 ml 38% Formaldehyd-Lösung auf 500 ml mit H₂O aufgefüllt

Bei zu starker Färbung des Geles konnte der dunkle Hintergrund mit einem Abschwächer (Tetanal) entfärbt werden, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar waren.

3.17 Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulose (Western Blot, Towbin et al. 1979)

Ein unfixiertes Polyacrylamidgel wurde auf ein entsprechend großes Nitrozelluloseblatt blasenfrei aufgelegt und in eine Blot-Apparatur (TE Series Transphor Electrophoresis Unit, Hoefer) eingespannt. Der elektrophoretische Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose erfolgte bei ca. 30 V und 0.3 A für 15-18 h. Der verwendete Transfer-Elektrophoresepuffer enthielt:

50 mM Tris-HCl pH 8.3

192 mM Glycin

20% Methanol

Da für diese Experimente die Prestained SDS Molecular Weight Marker (Sigma) verwendet wurden, konnte die Vollständigkeit des Transfers auf die Nitrozellulose anhand dieser Banden überprüft werden.

3.18 Spezifischer Nachweis der T-Antigen-Banden auf Nitrozellulose mit dem ProtoBlot Immunoscreening System (Promega Biotec)

Die Nitrozellulosefilter wurden für 1 h bei RT mit 3% Milchpulver in TBST abgesättigt und 5x 5 min mit TBST gewaschen.

TBST (Tris buffered saline + Tween 20):

10 mM Tris-HCl pH 8.0

150 mM NaCl

0.5% Tween 20

Danach erfolgte eine Inkubation von 30 min bei RT mit dem ersten Antikörper (Pab 108 oder 419; 80 µg/30 ml TBST), gefolgt von gründlichem Waschen mit TBST (5x 5 min). Dann wurde die Nitrozellulose mit dem zweiten Antikörper (mit alkalischer Phosphatase-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper; 4 µg auf 30 ml TBST) für 30 min bei RT inkubiert und anschließend gewaschen. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte im Dunkeln mit folgender Lösung:

10 ml Alkalische Phosphatase-Puffer: 100 mM Tris-HCl pH 9.5

100 mM NaCl

5 mM $MgCl_2$

+ 66 µl NBT-Substrat (Nitro-Blue-Tetrazolium 50 mg/ml)

+ 33 µl BCIP-Substrat (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate 50 mg/ml)

Die Farbreaktion wurde mit Stop-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA) beendet. Nachdem sich auf der Nitrozellulose auch die farbigen Größenmarker befanden, konnte man gleichzeitig Größe und Zustand des T-Antigens überprüfen (z. B. proteolytischer Abbau des T-Antigens).

3.19 Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Vorschrift von Bio-Rad. Dazu wurde eine Eichkurve mit verschiedenen Konzentrationen eines Standardproteins (bovine plasma gamma globulin, Bio-Rad) über einem Bereich von 1-25 μg erstellt.

Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden in entsprechenden Verdünnungen mit H_2O bzw. Puffer auf 800 μl Volumen in Küvetten eingestellt, mit 200 μl Farbreagenzkonzentrat (Bio-Rad) gemischt und die optische Dichte bei 595 nm gegen den Referenzwert ermittelt. Die Proteinkonzentration konnte dann durch einen Vergleich mit der Eichkurve bestimmt werden.

3.20 Präparation des Säulenmaterials für die Affinitätschromatographie (modifiziert nach Simanis and Lane, 1985; pers. Mitteilung von J. Espen und Dr. K.-H. Westphal)

Die Sepharose liegt in einer ethanolischen Lösung (20%) vor. 1 ml Protein-A-Sepharose CL-4B (entsprechend 0.3 g Gelmatrix) wurde 2x mit je 10 ml sterilem dest. H_2O gewaschen. Dazu wurde die Sepharose in H_2O aufgeschlämmt und die Flüssigkeit über der wieder abgesetzten Sepharose nach ca. 1 h vorsichtig abgenommen. Das zu diesem Zeitpunkt noch nicht sedimentierte Material im Überstand besteht aus Bruchstücken der Sepharosekügelchen (Fines). Diese Prozedur wurde 2x durchgeführt. Durch das Entfernen der Fines verhindert man ein Verstopfen der Säule und erreicht dadurch eine höhere Durchflußrate. Das Sepharosematerial wurde, da der später verwendete monoklonale Antikörper gegen PBS dialysiert ist, noch 2x in PBS aufgeschlämmt und gewaschen. Auch das Sepharosematerial für die Vorreinigungen wurde ebenso behandelt.

Zu 1 ml Säulenmaterial wurden 5-6 ml des monoklonalen Antikörpers Pab 419 (1 mg/ml) gegeben. Diese Mischung wurde dann für ca. 1 h bei RT vorsichtig geschüttelt und die Sepharose für ca. 30 min (600 x g) abzentrifugiert. Das Sediment wurde 3x mit 40 ml 0.1 M Borat-Puffer pH 8.2 und anschließend mit 40 ml 0.2 M Triethanolamin pH 8.2 gewaschen. Dann wurde als Kopplungsreagenz (Crosslinker) 0.02 M Dimethylpimelimidatdihydrochlorid in 20 ml 0.2 M Triethanolamin pH 8.2 zugegeben und für ca. 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Sepharose erneut abzentrifugiert (600 x g), mit 40 ml 0.02 M Triethanolamin pH 8.2 für 5 min bei RT inkubiert und 3x mit je 40 ml 0.1 M Borat-Puffer pH 8.2 gewaschen. Das Gel wurde in 10 ml 0.1 M Borat-Puffer mit 0.02% Natriumazid pH 8.2 resuspendiert und in eine Econo-Säule gefüllt.

In diesem Puffer konnte das Gel mehrere Tage aufbewahrt werden, ohne merkliche Aktivitätseinbuße der Antikörper. Vor dem ersten Gebrauch wurde die Säule mit dem jeweils zu verwendenden Elutionspuffer equilibriert und erneut mit 0.1 M Borat-Puffer gewaschen. Rund 98% des eingesetzten IgGs wurde an die Säule gekoppelt (Abb. 6).

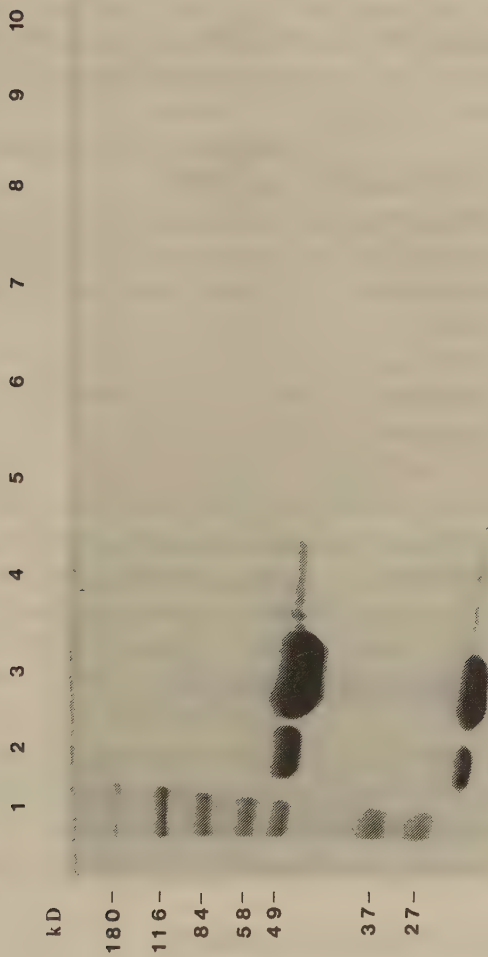
Nach jedem Experiment erfolgte eine Regenerierung des Säulenmaterials. Dazu wurde das Säulenmaterial sukzessiv mit 30 Säulenvolumina 250 mM Glycin-HCl pH 2.4, anschließend mit 60 ml 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 500 mM NaCl und 60 ml 100 mM Na-Azetat, 500 mM NaCl pH 4.5 gewaschen und mit 30 ml PBS neutralisiert. Das Säulenmaterial wurde in PBS+0.02% Natriumazid bis zum nächsten Experiment aufbewahrt und konnte ca. 10x verwendet werden.

Abb. 6. Kontrolle der Säulenmaterialpräparation für die Affinitätschromatographie

Nach jedem einzelnen Präparationsschritt wurden Proben entnommen und in einer 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Coomassie-Färbung. Als Marker dienten vorgefertigte Standard-Proteine (Prestained SDS Molecular Weight Marker).

- Spur 1: 10 μ l Prestained SDS Molecular Weight Marker (Sigma)
2: 10 μ l Pab 419 (1 mg/ml)
3: 50 μ l Pab 419 (1 mg/ml)
4: 100 μ l Durchlauf nach Kopplung von Pab 419 an Protein-A-Sepharose
5: 100 μ l Durchlauf nach 1. Waschschrift mit 0.1 M Boratpuffer
6: 100 μ l Durchlauf nach Waschschrift mit 0.2 M Triethanolamin
7: 100 μ l Durchlauf nach Crosslink-Reaktion
8: 100 μ l Durchlauf nach Waschschrift mit 0.02 M Triethanolamin
9: 100 μ l Durchlauf nach Waschschrift mit 0.1 M Boratpuffer
10: 100 μ l Durchlauf nach Vorelution mit 20 mM Triethylamin, 10% Glycerin pH 10.8

Spur 3 wurde mit Pab 419 überladen, um eventuell vorhandene Abbauprodukte des Antikörpers bzw. Begleitproteine zu sehen. In Spur 4 sind kleine Mengen der schweren und leichten Kette des Antikörpers nach Bindung an das Säulenmaterial erkennbar. Im Vergleich zu Spur 2 wurde hier aber das 10fache Volumen des Überstandes eingesetzt. Vergleicht man beide Spuren, so ist festzustellen, daß rund 98% des Antikörpers an die Säulenmatrix gebunden haben. In den verbleibenden Spuren sind keine Antikörperuntereinheiten mehr erkennbar. Selbst bei der Vorelution (pH 10.8) lösten sich keine Antikörper von der Säule. Dies bedeutet eine gute kovalente Bindung der Antikörper über den Crosslinker an die Matrix (Abb. s. nächste Seite).



3.2.1 Reinigung von T-Antigen durch die Affinitätschromatographie

3.2.1.1 Aufschluß der Zellen

Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 1800 x g) und mit eiskaltem Hanks-Puffer gewaschen. Pro Experiment wurden ca. 2×10^6 Zellen in 20 ml Lysis-Puffer pH 9.0 ($1-1.5 \times 10^7$) lysiert.

Lysis-Puffer (nach Simanis and Lane, 1985):

- 50 mM Tris-HCl
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1 mM DTT
- 10% Glycerin
- 1 mM PMSF
- 0.5% NP-40

Nach der Lyse der Zellen (30 min, 0°C) wurde das Lysat abzentrifugiert (15 min, 12 000 x g) und die Zellfragmente in 5 ml Lysis-Puffer gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt.

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

3.2.1.2 Erste Vorreinigung des Zellextraktes

Der Überstand wurde zur Entfernung von Partikeln und Lipiden über Sepharose 4B geleitet. Zusätzlich scheint in der Lösung vorhandenes Aktin auf dem Säulenmaterial zu aggregieren. Dieses Aktin würde unweigerlich im weiteren Versuchsablauf die Affinitätssäule verstopfen.

3.2.1.3 Zweite Vorreinigung des Zellextraktes

Das vorgereinigte Lysat wurde 3x über ungekoppelte Protein-A-Sepharose gegeben, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen.

321.4 Bindung des T-Antigens an die Affinitätssäule

Die mit dem Antikörper Pab 419 gekoppelte Affinitätssäule wurde für ca. 1 h mit dem Lysis-Puffer equilibriert. Das gereinigte Lysat wurde, je nach Volumen des Lysates bzw. Alters und der Verwendungshäufigkeit der Säule, 4-6x über die Säule geleitet.

321.5 Reinigungsschritte der Affinitätssäule

Die Affinitätssäule wurde mit 30 Säulenvolumina Puffer C und 20 Säulenvolumina Puffer D gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Alle verwendeten Puffer waren sterilfiltriert.

Puffer C:

50 mM Tris-HCl pH 8.0
500 mM LiCl
1 mM EDTA
10% Glycerin

Puffer D:

10 mM PIPES pH 7.8
5 mM NaCl
1 mM EDTA
10% Glycerin

321.6 Elution des T-Antigens

Das an den Antikörper gebundenen T-Antigen wurde, soweit nicht anders angegeben, mit 20 mM Triethylamin, 10 % Glycerin, pH 11.0 von der Säule eluiert. Das Eluat (insgesamt 30 ml; ca. 0.5 ml pro Fraktion) wurde direkt in einen Neutralisationspuffer (1 M HEPES pH 7.5) eingeleitet. Die Endkonzentration betrug 30-50 mM HEPES; der pH-Wert lag zwischen 7.5 und 8.0. Das T-Antigen wurde bis zu 90% gereinigt und dabei Konzentrationen bis zu 80 µg/ml erreicht.

4. Ergebnisse

Sandra Thompson (1984) konnte im Rahmen ihrer Diplomarbeit in unserem Labor die drei T-Antigen-Subklassen, um die es sich in dieser Arbeit handelt (5 S, 7 S und 14 S; abgebildet in Runzler et al., 1987), eindrucksvoll darstellen. Dazu wurden ^{32}P -markierte Zellextrakte von SV40 infizierten TC7-Zellen (44 h nach Infektion) durch Dichtegradientenzentrifugation (SW55-Rotor, 45000 Upm, 4°C, 16 h) aufgetrennt, die T-Antigen-Subklassen mit Hamster-Tumor-Serum und Staphylococcus aureus immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert. Die gefundenen T-Antigen-Subklassen zeigten praktisch das gleiche Sedimentationsverhalten, wie bei Bradley et al. (1982) beschrieben.

In früheren Mitteilungen wurde berichtet, daß die drei Subklassen monomeren, dimeren und tetrameren T-Antigen-Formen entsprechen (Bradley et al., 1982; Gidoni et al., 1982; Scheidtmann et al., 1984). Da aber sowohl die Proteinkonformation als auch die Proteinmasse das Sedimentationsverhalten beeinflussen kann, hat Sandra Thompson versucht, die Identität der Subklassen durch chemische "Crosslinking"-Experimente zu bestätigen. Das Ergebnis dieser Versuche war, daß die 5 S Form monomerem und die 14 S Form tetramerem T-Antigen entspricht. Ob es sich bei der 7 S Form um ein Dimer oder aber um eine Modifikation der monomeren Subklasse handelt, konnte damals nicht eindeutig geklärt werden. Vergleicht man Ergebnisse anderer Autoren (Mastrangelo et al., 1985; Ryder et al., 1985), so erscheint die Existenz eines dimeren T-Antigens als die durchaus wahrscheinlichste Annahme.

4.1 Oligomerisierung von neu synthetisiertem T-Antigen

Aus früheren "Pulse-Chase"-Experimenten (Fanning et al., 1981; Greenspan and Carroll, 1981) war bekannt, daß neu synthetisiertes T-Antigen als 5-7 S Form erscheint und diese T-Antigen-Form die Vorstufe für

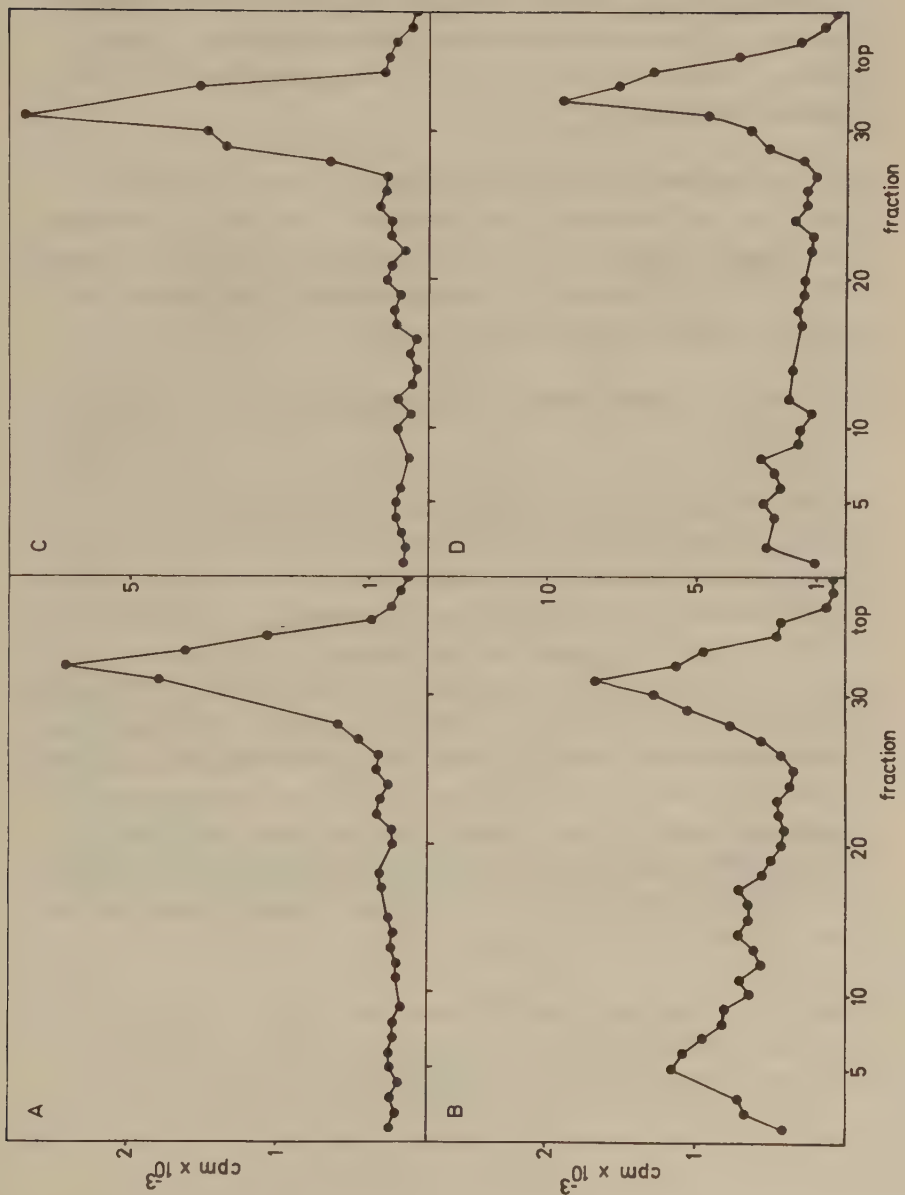
tetrameres T-Antigen darstellt. Somit wurde in den damaligen Untersuchungen nicht zwischen monomerem und dimerem T-Antigen differenziert. Durch Ergebnisse in der Diplomarbeit von Sandra Thompson (abgebildet in Runzler et al., 1987) angeregt, wurde nochmals ein "Pulse-Chase"-Experiment durchgeführt, in dem besonderes Augenmerk auf die Oligomerisierung von neu synthetisiertem T-Antigen gerichtet wurde (Abb. 7). Weiterhin sollte untersucht werden, ob und wie dieses neu synthetisierte T-Antigen zum tetrameren T-Antigen oligomerisiert. Außerdem wäre es interessant, ob das dimere T-Antigen bei der Oligomerisierung zur tetrameren Form beteiligt ist, oder ob die 7 S Form durch einen anderen Bildungsmechanismus entsteht.

Dazu wurden SV40 infizierte TC7-Zellen zu einem frühen (24 h) bzw. einem späten Zeitpunkt (48 h) nach Infektion für 15 min mit ^{35}S -Methionin markiert. Nach 15 min, 30 min und 60 min in Gegenwart von hundertfachem Überschuß an nicht markiertem Methionin wurden die Zellextrakte durch Sedimentation in Saccharose-Dichtegradienten fraktioniert und die T-Antigen-Subklassen durch Immunpräzipitation und SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Fluorographie wurden die T-Antigen-Banden aus den Gelen ausgeschnitten und der Einbau von ^{35}S darin ermittelt.

In allen Präparationen war monomeres T-Antigen vorhanden. Hingegen war kein signifikanter Gipfel von dimerem T-Antigen, selbst in den "Chase"-Perioden von 15 min und 30 min (Daten nicht gezeigt), zu erkennen. Es wäre ungefähr im Bereich um Fraktion 20 zu erwarten gewesen. Dimeres T-Antigen ist also wahrscheinlich kein Zwischenprodukt auf dem Weg zur tetrameren Form des T-Antigens, sondern muß wohl durch einen anderen Mechanismus gebildet werden. Es gäbe noch die Möglichkeit, daß dimeres T-Antigen ein sehr kurzlebiges Zwischenprodukt beim Aufbau der tetrameren Form darstellt. Dies erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, da die dimere T-Antigen-Subklasse mengenmäßig einen relativ großen Anteil sowohl in den Phosphatmarkierungsexperimenten

Abb. 7: Fraktionierung von neu synthetisiertem T-Antigen nach Dichtegradientenzentrifugation

SV40 infizierte TC7-Zellen (6×10^6 Zellen) wurden zu Zeitpunkten 24 h (A, B) bzw. 48 h (C, D) nach Infektion für 15 min mit ^{35}S -Methionin ($500 \mu\text{Ci/ml}$ pro TC7 Platte) markiert ("Pulse"). In dieser Abbildung sind nur die Ergebnisse ohne "Chase" (A, C) und einer "Chase"-Periode von 60 min dargestellt. Das T-Antigen in jeder Fraktion wurde mit Pab 108 immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die T-Antigen-Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten. Die zeichnerische Darstellung erfolgte auf Grund der ermittelten Zerfälle pro Minute. Das Auftreten der T-Antigen-Subklassen konnte aus einem parallel mitgeführten Markergradienten ermittelt werden (β -Galaktosidase in Fraktion 3; alkalische Phosphatase in Fraktion 18; Hämoglobin in Fraktion 30). Monomeres T-Antigen erscheint zwischen den Fraktionen 28-36; tetrameres in den Fraktionen 3-9; dimeres T-Antigen tritt nicht in Erscheinung. Es müßte im Bereich um Fraktion 20 zu erkennen sein (Abb. s. nächste Seite).



von Sandra Thompson (Diplomarbeit, 1984) als auch in den vielen Dot-Blot-Analysen im Rahmen dieser Arbeit darstellt (z. B. Abb. 9B). Eine alternative und auch wahrscheinlichere Erklärung für das Zustandekommen der 7 S Form wäre eine Dissoziation von tetramerem T-Antigen in dimeres T-Antigen entweder in der Zelle oder in vitro auf Grund der Versuchsbedingungen.

Aber ein zusätzliches interessantes Ergebnis hat dieses Experiment erbracht: Die Oligomerisierung von monomerem T-Antigen zur tetrameren Form geschieht deutlich schneller als zum Zeitpunkt 24 h nach Infektion (B) als 48 h nach Infektion (D). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Wachter et al. (1985).

4.2 Bindung der verschiedenen T-Antigen-Subklassen an die pSV-wt DNA

Um die Problematik der widersprüchlichen Ergebnisse der früheren Arbeiten etwas zu erhellen, wurde zunächst die DNA-Bindung in einem herkömmlichen Experiment nach McKay (1981) mit der Aktivität in einem empfindlicheren "Target-bound Assay" (Hinzpeter et al., 1986) verglichen. In dem "Target-bound Assay" werden zelluläre Proteine vor der eigentlichen Bindung der T-Antigen-Subklassen an die DNA aus dem Reaktionsansatz entfernt. Somit kann der Einfluß von eventuell unspezifisch DNA-bindenden oder mit T-Antigen interagierenden Proteinen ausgeschlossen werden. Auch wird hier im Gegensatz zu Experimenten nach der Methode von McKay auf eine Zugabe von unmarkierter Konkurrenz-DNA verzichtet. Der klare Vorteil dieser empfindlicheren Methode ist, daß Protein-DNA-Wechselwirkungen weitestgehend ohne Fremdeinflüsse untersucht werden können (Abb. 8).

Gleiche Volumina jeder T-Antigen-Subklasse wurden mit Pab 108 immungefällt. Dieser monoklonale Antikörper hat, wie sich in "DNase-Footprints" herausgestellt hat, keinen erkennbaren Einfluß auf die Bin-

Abb. 8: Vergleich der Bindung von T-Antigen-Subklassen in zwei unterschiedlichen Bindungsmethoden

Die T-Antigen-Subklassen wurden aus SV40 infizierten TC7-Zellen zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion präpariert.

A. Bindungstest nach McKay (1981)

Je 0.1 ml jeder Subklassen-Fraktion wurde auf 80 mM KCl eingestellt (Endvolumen 0.4 ml + Puffer B) und 1 h bei 0°C mit 0.25 µg endmarkierten HindIII-Fragmenten der pSV-wt DNA und 5 µg Ultraschall-behandelter *E. coli* DNA inkubiert. T-Antigen-DNA-Komplexe wurden mit Pab 108 immungefällt, die durch SDS-Behandlung wieder freigesetzte DNA im Agarosegel (2%) aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen.

Marker (M): 12.5 ng HindIII-geschnittene pSV-wt DNA

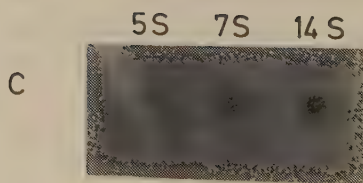
B. "Target-bound Assay" nach Hinzpeter et al. (1986)

Je 0.1 ml jeder Subklassen-Fraktion (bei gleicher Behandlung wie in A.) wurde direkt mit Pab 108 immungefällt. Die Bindung der pSV-wt DNA erfolgte gemäß dem Bindungstest (siehe Methoden); Inkubation 1 h.

C. Dot-Blot-Analyse

Je 5 µl der Subklassen-Fractionen wurden auf Nitrozellulose aufgetragen. Nach Behandlung mit Pab 108 und ¹²⁵I-markiertem Anti-Maus-IgG wurde die T-Antigen-Menge durch Autoradiographie und Densitometrie ermittelt (Abb. s. nächste Seite).

SPECIFIC ACTIVITY OF DNA BINDING



dung des T-Antigens an den Replikationsursprung (Ryder et al., 1985; Vakalopoulou and Fanning, persönliche Mitteilung). Die Bindung erfolgte an pSV-wt DNA-Fragmente. Wie in Abb. 8B zu sehen ist, wurden in dem "Target-bound Assay" von allen drei Subklassen mehr der Origin enthaltenden DNA gebunden als durch die jeweils gleiche T-Antigen-Menge im konventionellen Experiment nach McKay (1981; Abb. 8A). Ein Vergleich der gebundenen DNA-Mengen mit der T-Antigen-Menge in jeder Subklasse, festgestellt durch eine Dot-Blot-Analyse, zeigt, daß das monomere T-Antigen wesentlich mehr DNA binden kann als die entsprechende Menge der tetrameren T-Antigen-Form. Dieses Ergebnis, das mit dem "Target-bound Assay" erhalten wurde, ist konsistent mit bereits publizierten Daten (Oren et al., 1980; Dorn et al., 1982; Fanning et al., 1982; Gidoni et al., 1982; Scheidtmann et al., 1984) und widerspricht den Ergebnissen, die mit D2- und SV80-T-Antigenen erhalten wurden (McKay, 1981; Myers et al., 1981; Bradley et al., 1982).

4.3 Bindung der T-Antigen-Subklassen an pSV-wt DNA und pON-wt DNA

Nachdem die höhere Empfindlichkeit des "Target-bound Assay" für die Bindung an die pSV-wt DNA gezeigt war, sollte nun das DNA-Bindungsverhalten der T-Antigen-Subklassen auch an die pON-wt DNA (nur Bindungsstelle I) im Vergleich zur pSV-wt DNA (Bindungsstellen I und II) untersucht werden.

Die Präparation der T-Antigen-Subklassen erfolgte aus SV40 infizierten TC7-Zellen nach einer Infektionszeit von 48 h. Es wurden equimolare Mengen an Origin-enthaltender DNA dieser beiden DNAs einzeln und als Mischung im DNA-Überschuß verwendet.

Für das Experiment mit der pON-wt DNA wurde pro Ansatz 125 ng geschnittene (EcoRI/SalI) DNA verwendet, für die Untersuchung mit pSV-wt DNA 250 ng (HindIII) und für das Mischexperiment 65 ng pON-wt DNA und 125 ng pSV-wt DNA. Wo nötig, wurden in diesen Bindungsstudien unmarkierte pAT 153 DNA-Fragmente zu den jeweiligen

Proben zugegeben, um eine Gesamtkonzentration von 250 ng DNA in jeder Probe zu erreichen. Die T-Antigen-Bindung an diese SV40-DNA-
"Templates" wurde nach Erreichen des Dissoziationsgleichgewichts
(nach ca. 2 h) bestimmt (Abb. 9A).

Parallel zu diesem Assay wurde eine Dot-Blot-Analyse des T-Antigens durchgeführt (Abb. 9B). Dabei wurden, wie in der Graphik angegeben, bestimmte Volumina von jeder T-Antigen-Subklasse auf Nitrozellulose pipettiert (siehe Material und Methoden), mittels dem Biotin-Streptavidin-System angefärbt und densitometrisch die relative Intensität der Farbreaktion der Fraktionen zueinander bestimmt. Die relative Menge der drei Subklassen 5 S, 7 S und 14 S steigt bis zur Sättigung der Membran mit Proteinen linear an.

Zunächst zeigt die Abb. 9A, daß, zumindest qualitativ, alle drei Subklassen an beide DNA-Proben (Bindungsstellen I und II ; nur Bindungsstelle I) binden können.

Wenn man die Menge an gebundener Origin-DNA (Abb. 9A) mit der jeweiligen T-Antigen-Menge von jeder Subklasse vergleicht (Abb. 9B), so kann man abschätzen, daß das monomere T-Antigen ungefähr acht- bis zehnmal mehr Origin-DNA bindet als eine vergleichbare Menge tetrameren T-Antigens. Dieses Ergebnis bestätigt und ergänzt frühere Befunde, wonach monomeres T-Antigen mehr Origin-DNA zu binden vermag als oligomeres T-Antigen (Oren et al., 1980; Dorn et al., 1982; Fanning et al., 1982; Gidoni et al., 1982; Scheidtmann et al., 1984).

Das Experiment mit der equimolaren Mischung von pSV-wt DNA und pON-wt DNA liefert noch einen weiteren interessanten Aspekt. Beide DNAs konkurrieren um das angebotene T-Antigen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Bindungsaffinität des T-Antigens für die beiden DNAs ähnlich sein muß.

Abb. 9: T-Antigen-Subklassen-Bindung an pSV-wt DNA und pON-wt DNA

Die Subklassen wurden aus SV40 infizierten TC7-Zellen zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion isoliert.

A. "Target-bound Assay"

Je 0.1 ml von jeder Subklasse wurden mit Pab 108 immunpräzipitiert und in einen "Target-bound Assay" (siehe Methoden) eingesetzt. Gleiche molare Mengen an Origin-enhaltender pSV-wt DNA und pON-wt DNA bzw. eine Mischung aus beiden DNAs wurden auf Bindung getestet; Inkubation für 2 h bei 0°C. Wo nötig, wurde unmarkierte pAT 153 DNA zugegeben, um eine Gesamtmenge an DNA von 250 ng zu erreichen.

Marker (M): je 12.5 ng der pON-wt bzw. pSV-wt DNA

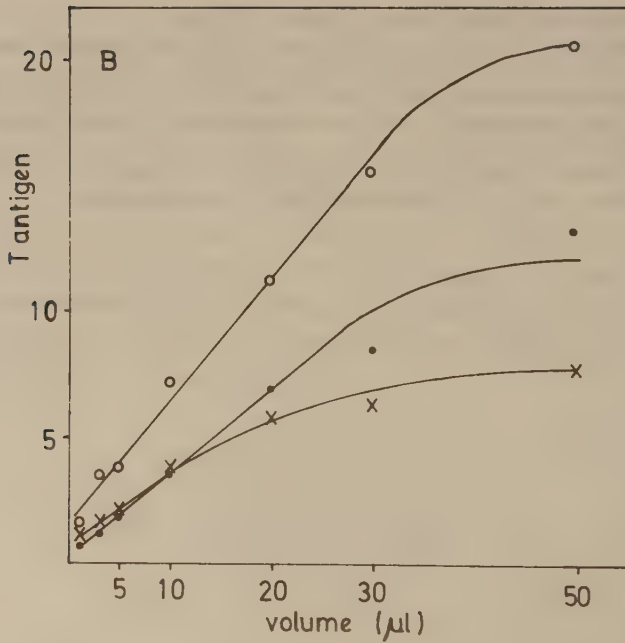
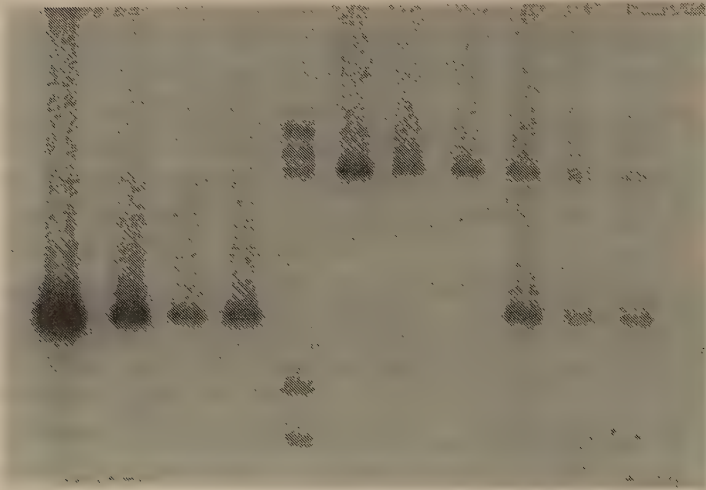
Die Pfeile am rechten Bildrand zeigen die DNA-Fragmente, die die T-Antigen-Bindungsstellen (Origin) enthalten.

B. Graphische Darstellung einer Dot-Blot-Analyse

Unterschiedliche Volumina der T-Antigen-Subklassen wurden auf Nitrozellulose aufgetragen und mit dem Biotin-Streptavidin-System angefärbt. Die densitometrische Auswertung der unterschiedlichen Farbintensitäten der T-Antigen-Subklassen gibt die verschiedenen T-Antigen-Mengen zueinander an (o = 5 S; x = 7 S; ● = 14 S). Bei großen Volumina wurde die Membran mit Gesamtprotein gesättigt. Die Einheiten der T-Antigen-Skala wurden willkürlich festgesetzt (Abb. s. nächste Seite).

pON-wt				pSV-wt				pON-wt pSV-wt		
M	5S	7S	14S	M	5S	7S	14S	5S	7S	14S

A



4.4 Affinität der T-Antigen-Bindung an die SV40-DNA

In zahlreichen "Target-bound Assays" wurden die Dissoziationskonstanten für jede T-Antigen-Subklasse bestimmt. Die Bindungsstudien wurden nach Scatchard (1949) ausgewertet, um die Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die DNA-Bindung zu erhalten.

Hierzu wurden in jedem Experiment die T-Antigen-Subklassen aus sechs großen SV40 infizierten TCT Platten (insgesamt ca. 1.2×10^7 Zellen), wie in Material und Methoden beschrieben, aufgetrennt und isoliert. Diese Isolierung erfolgte zu Zeitpunkten 39 bis 40 h und 48 h nach Infektion. Die durch Immunfällung gereinigten T-Antigen-Subklassen wurden auf ihr DNA-Bindungsverhalten als Funktion der DNA-Konzentration untersucht. In diesen Studien wurde die pSV-wt DNA und die pON-wt DNA verwendet. Die gebundenen DNA-Fragmente wurden aus den Agarosegelen ausgeschnitten, in Szintillationslösung aufgenommen und die Werte in einem Szintillationszählgerät bestimmt. Um quantitative Aussagen machen zu können, wurden die absoluten Mengen der gebundenen Fragmente im Vergleich zu Markerfragmenten mit bekannter DNA-Konzentration bestimmt, die ebenfalls auf den gleichen Gelen mit aufgetrennt wurden. Aus den Zerfällen pro Minute für die Markerfragmente, die den Origin enthielten, konnte die spezifische Aktivität (cpm/ng Marker-DNA C-Fragment) dieser Markerfragmente ermittelt werden, die in weiteren Berechnungen nach Scatchard (1949) die Menge der Origin-enhaltenden DNA-Masse in den Gelbanden, die spezifisch von T-Antigen gebunden wurden, liefert.

Aus der graphischen Darstellung der gebundenen/freien DNA gegen die gebundene DNA lassen sich die R_0 -Werte (Sättigungskonzentration für die eingesetzte DNA) und K_D -Werte (Gleichgewichtsdissoziationskonstante) ermitteln (Abb. 10; Tab. 1).

Aus diesen Experimenten wurden für alle drei Subklassen sehr ähnliche Werte, im Durchschnitt ein K_D von ungefähr 0.4 nM, für die Bin-

Abb. 10: Beispiel für ein Scatchard-Diagramm, stellvertretend für alle Affinitätsstudien

Die durch Immunfällung gereinigten T-Antigen-Subklassen wurden auf ihr DNA-Bindungsverhalten untersucht. Das zahlenmäßige Verhältnis von gebundener zu freier DNA im Gleichgewichtszustand ist als Funktion der Konzentration gegen die gebundene DNA aufgetragen (Scatchard, 1949). Die Steigung (K_D^{-1}) wurde mit einem Hewlett-Packard-Programm für lineare Regressionsanalyse bestimmt. Die Korrelationskoeffizienten lagen in nahezu allen Experimenten zwischen 0.9 und 1.0.

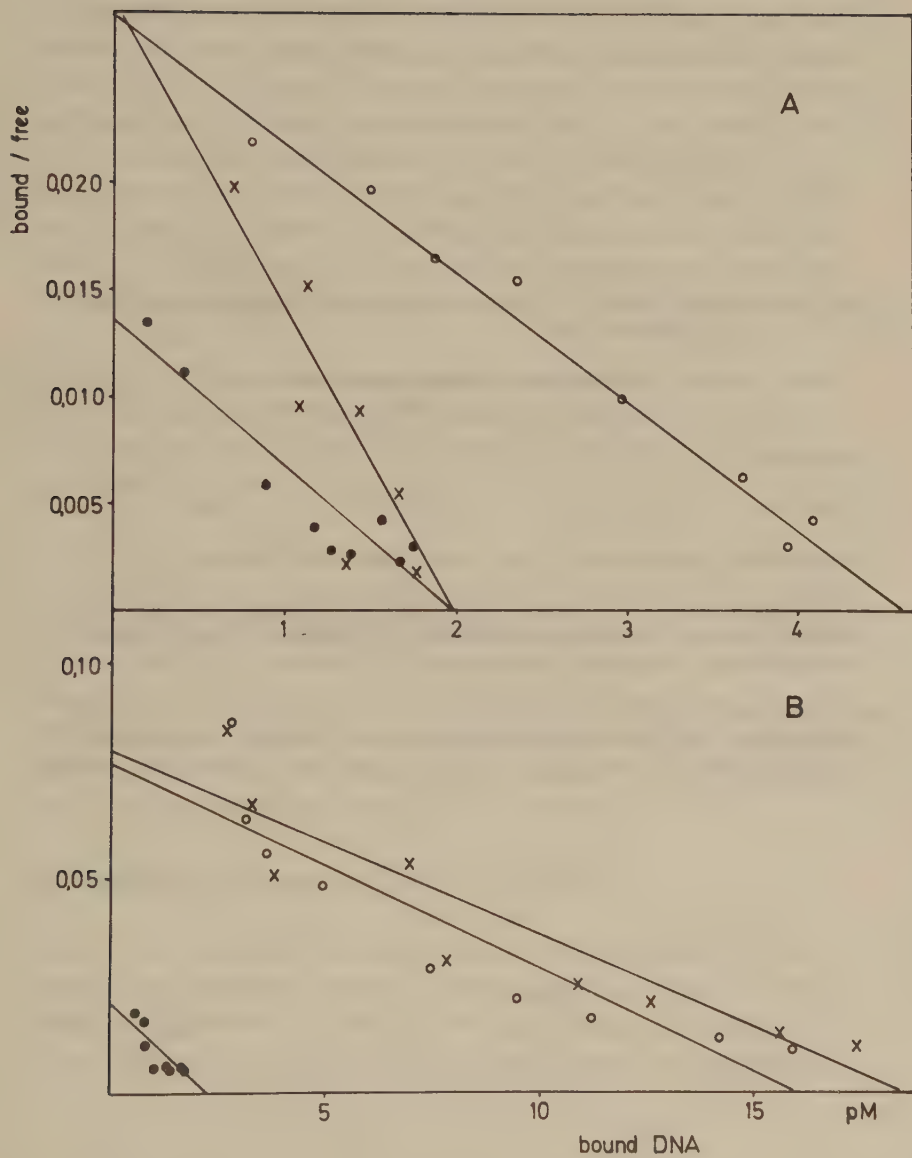
Die T-Antigen-Subklassen wurden zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion präpariert und mit verschiedenen Mengen endmarkierter pSV-wt DNA/HindIII-Fragmenten (A) bzw. pON-wt DNA/EcoRI-Sall-Fragmenten (B) inkubiert. Die spezifische Radioaktivität (cpm) der Fragmente war bekannt. Die Dissoziationskonstanten (nM) in den beiden hier gezeigten Experimenten betrugen:

A.	0.2 (5 S)	0.1 (7 S)	0.1 (14 S)
B.	0.2 (5 S)	0.2 (7 S)	0.1 (14 S)

Die Korrelationskoeffizienten waren:

A.	0.99 (5 S)	0.85 (7 S)	0.93 (14 S)
B.	0.89 (5 S)	0.92 (7 S)	0.71 (14 S)

Verwendete Symbole: o = 5 S; x = 7 S; ● = 14 S
(Abb. s. nächste Seite)



Tab. 1: Bindungsaffinität der T-Antigen-Subklassen für die pSV-wt DNA und die pON-wt DNA

Subklasse	Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D (nM)		
	5 S	7 S	14 S
pSV-wt DNA	0.4 ± 0.1^a	0.5 ± 0.3^a	0.3 ± 0.2^a
pON-wt DNA	0.3 ± 0.2^b	0.3 ± 0.2^b	0.2 ± 0.05^b

a) Mittelwerte mit Standardabweichung für fünf voneinander unabhängige Bestimmungen: zwei Ergebnisse zum Zeitpunkt 39 h nach Infektion, drei Ergebnisse 48 h nach Infektion

b) Mittelwerte mit Standardabweichung für drei bzw. vier voneinander unabhängige Bestimmungen: ein Ergebnis zum Zeitpunkt 40 h nach Infektion, zwei (7 S) bzw. drei (5 S; 14 S) Ergebnisse 48 h nach Infektion

dung an die pSV-wt DNA erzielt. Auch die Dissoziationskonstanten für die drei Subklassen bei der Bindung an die pON-wt DNA waren ebenfalls einander sehr ähnlich und durchaus mit den für die pSV-wt DNA gefundenen Daten vergleichbar. Die ermittelten Werte für die Dissoziationskonstanten sowohl für 39 bis 40 h als auch für 48 h nach Infektion unterschieden sich kaum voneinander und sind in Tab. I zusammengefaßt. Diese Ergebnisse bewegen sich im Rahmen der Daten von Dixon and Nathans (1985; 4×10^{-9} M), Jones and Tjian (1984; 5×10^{-10} M), Hinzpeter et al. (1986; 10×10^{-10} M) und Schirmbeck and Deppert (1988; 20×10^{-10} M), obwohl die Versuchsbedingungen von einer Studie zur nächsten unterschiedlich waren.

In diesen, wie in den vorangegangenen Experimenten, wurde parallel durch Dot-Blot-Analysen die relative T-Antigen-Menge in jeder Subklasse ermittelt. Vergleichend wurde ein Verhältnis von Monomer : Dimer : Tetramer wie 1 : 2 : 4 gefunden.

Da alle drei T-Antigen-Subklassen durchaus vergleichbare Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für die beiden verwendeten DNAs zeigen, kann die Bindungsaffinität der T-Antigen-Bindung nicht für das unterschiedliche Bindungsverhalten verantwortlich sein. Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, daß die beobachteten Unterschiede im DNA-Bindungsverhalten der drei Subklassen (Abb. 8, Abb. 9) in erster Linie auf eine unterschiedliche spezifische Bindungsaktivität für die Bindung an den Replikationsursprung zurückzuführen sind.

4.5 Spezifische Aktivität der T-Antigen-DNA-Bindung

Ein korrekter Vergleich der spezifischen Bindungsaktivitäten für die Bindung von T-Antigen an den Replikationsursprung erfordert, daß die Bindungsexperimente mit gleichen T-Antigen-Mengen von jeder der drei Subklassen durchgeführt werden. Dazu wurde die Konzentration

des T-Antigens für jede Subklasse durch einen Immun-Dot-Blot (Biotin-Streptavidin-System) mit densitometrischer Messung vor dem DNA-Bindungstest ermittelt. Die Konzentration der oligomeren T-Antigen-Formen wurde anschließend durch Verdünnung mit Bindungspuffer B auf die T-Antigen-Konzentration der monomeren Fraktion eingestellt.

Das immungefällte T-Antigen jeder Subklasse wurde dann auf Bindung an pSV-wt DNA-Fragmente und pON-wt DNA-Fragmente (Abb. II) mit verschiedenen Volumina und damit Mengen von T-Antigen getestet.

Die spezifische Aktivität der Bindung an die pSV-wt DNA (Abb. IIA) war für monomeres (5 S) und dimeres (7 S) T-Antigen für alle verwendeten Volumina und damit T-Antigen-Mengen am größten. Die relative spezifische Bindungsaktivität der 5 S und 7 S T-Antigen-Formen schwankte leicht von Versuch zu Versuch, jedoch wurde von den monomeren und dimeren T-Antigen-Fractionen ungefähr fünf- bis achtmal mehr Origin-DNA gebunden als von gleichen Mengen der tetrameren Form. Vergleichbare Ergebnisse lieferten auch die Bindungsexperimente mit der pON-wt DNA (Abb. IIB). In beiden Versuchsreihen lagen die DNA-Templates im Überschuß vor.

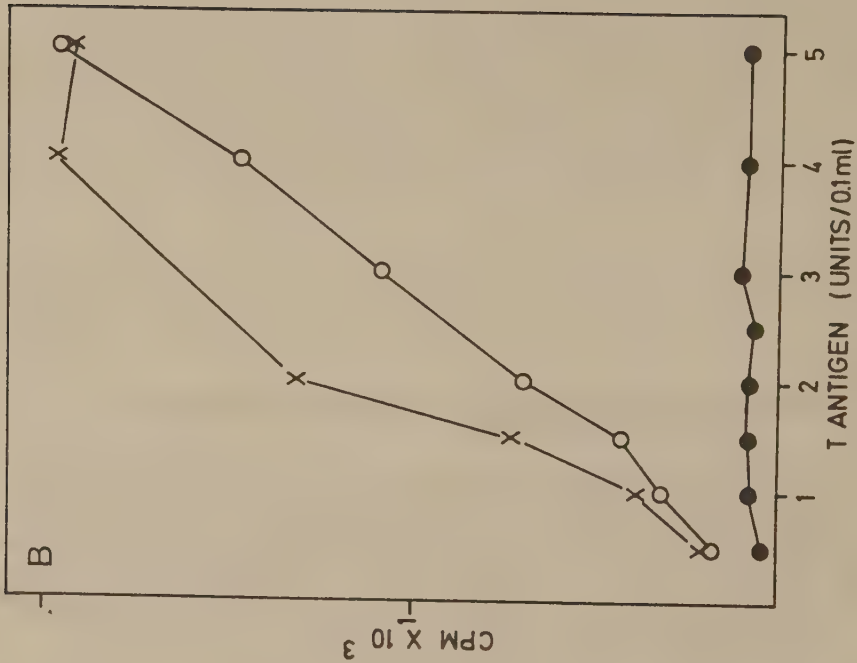
Diese Ergebnisse stimmen auch mit Beobachtungen anderer Autoren überein (Oren et al., 1980; Dorn et al., 1982; Fanning et al., 1982; Gidoni et al., 1982; Scheidtmann et al., 1984) und zeigen, daß die spezifische Bindungsaktivität des tetrameren T-Antigens sehr viel geringer ist als die der monomeren und dimeren Subklasse.

Interessanterweise waren die Bindungskurven für alle drei T-Antigen-Subklassen, wenn sie über einen großen T-Antigen-Mengenbereich durchgeführt wurden, nicht linear, sondern deuteten auf einen sigmoiden Kurvenverlauf hin. Bei Verwendung von größeren Mengen von tetramerem T-Antigen konnte eine Zunahme der spezifischen Bindungsaktivität beobachtet werden. Durch die relativ starke Verdünnung die-

Abb. II: DNA-Bindungsaktivität der T-Antigen-Subklassen als Funktion der T-Antigen-Menge

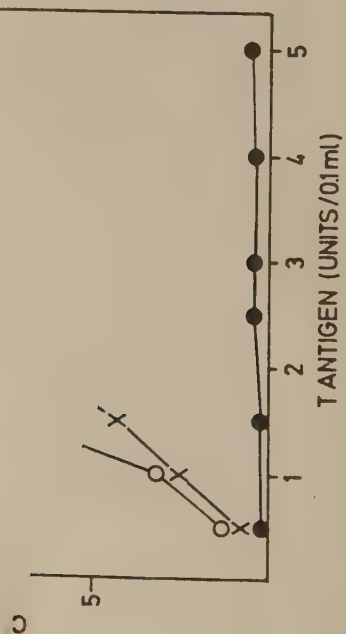
Die T-Antigen-Subklassen stammen aus infizierten TC7-Zellen zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion. Die T-Antigen-Menge in jeder Subklasse wurde durch Dot-Blot-Analyse (Biotin-Streptavidin-System) vor den Experimenten bestimmt. Die T-Antigen-haltigen Lösungen wurden durch Verdünnung mit den DNA-Bindungspuffern A und B auf 10 mM HEPES pH 7,8, 80 mM KCl, 0,5 M MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF eingestellt. Die Verdünnung erfolgte so, daß sich nun in jeder Subklassen-Fraktion die gleiche Menge der entsprechenden T-Antigen-Subklasse, bezogen auf die monomere Fraktion, befand. Ansteigende Volumina (50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 250 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl) jeder Subklasse wurden dann immunpräzipitiert und auf spezifische Bindung an pSV-wt DNA-Fragmente (0,25 µg) und an pON-wt DNA-Fragmente (0,25 µg) getestet. Die gebundenen Origin-DNA-Fragmente wurden aus den Gelen ausgeschnitten, mit einem Szintillationsmeßgerät gezählt und diese Werte als Funktion der immunreaktiven Menge an T-Antigen graphisch dargestellt. Eine Einheit des T-Antigens ist empirisch definiert als T-Antigen-Menge in 0,1 ml der unverdünnten Ausgangslösung der monomeren Fraktion.

Symbole: o = 5 S; x = 7 S; ● = 14 S
(Abb. s. nächste Seite)



Diese als
übereinstimmend
et al., 1971
Bindungsak-
tion.
die der monoc

Interessanterweise
Subklassen, wenn s.
durchgeführt wurden,
den Kurvenverlauf hin. 1
tetramerem T-Antigen kontr.
aktivität beobachtet werden.



ser Fraktion mit dem Bindungspuffer B auf die Konzentration der monomeren Form ist eine Dissoziation der tetrameren Form in Untereinheiten nicht auszuschließen. Diese Dissoziationsprodukte könnten wieder eine erhöhte DNA-Bindung zeigen. Es wäre auch denkbar, daß bei Verwendung größerer Proteinmengen (Daten nicht gezeigt) die tetramere Fraktion einen höheren Anteil an monomeren und dimeren Subklassen, die in der Dichtegradientenzentrifugation eventuell nur unvollständig abgetrennt wurden, enthält. Diese Verunreinigung mit bindungsaktiven Untereinheiten könnte so für die Zunahme der spezifischen Bindungsaktivität in der tetrameren Fraktion verantwortlich sein.

4.6 Unterschiedliche spezifische Aktivität der T-Antigen-DNA-Bindung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion

In diesen Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit sich die spezifische DNA-Bindungsaktivität der drei T-Antigen-Subklassen mit zunehmender Infektionszeit verändert.

Hierzu wurden für jede Infektionszeit drei große TC7 Platten zeitlich abgestimmt so behandelt, daß sie zum jeweiligem Infektionsstart ca. 2×10^6 Zellen pro Platte erreicht hatten und so die Anzahl der Zellen zu jedem Infektionsbeginn vergleichbar war. Die T-Antigen-Subklassen von je zwei SV40 infizierten TC7 Platten wurden zu den Zeitpunkten 40, 45, 50, 60 und 72 h nach Infektion präpariert, durch Immunpräzipitation gereinigt und die spezifische DNA-Bindungsaktivität an die pSV-wt DNA ermittelt. Die DNA lag dabei im Überschuß vor.

Es wurden jeweils gleiche Volumina (100 μ l) von jeder T-Antigen-Subklasse zu jeder Infektionszeit in die Bindungsstudie eingesetzt (Abb. 12A). Die gebundene Origin-DNA-Menge wurde wieder durch Szintillationszählung der aus den Gelen ausgeschnittenen Banden bestimmt. Die relative Menge der T-Antigen-Subklasse in jeder Probe wurde durch einen Immun-Dot-Blot (Biotin-Streptavidin-System) mit anschließender

Abb. 12: Spezifische Aktivität der DNA-Bindung an die SV40-DNA als Funktion der Zeit nach Infektion

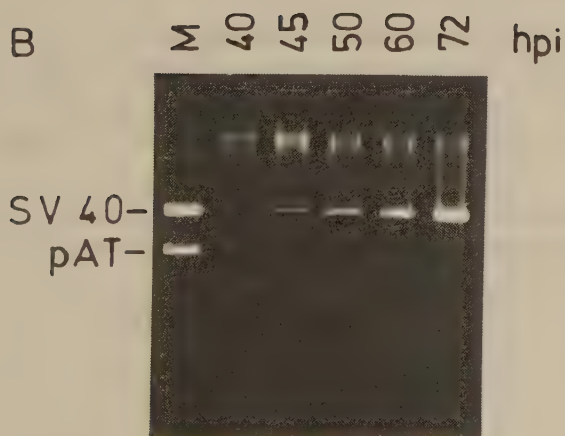
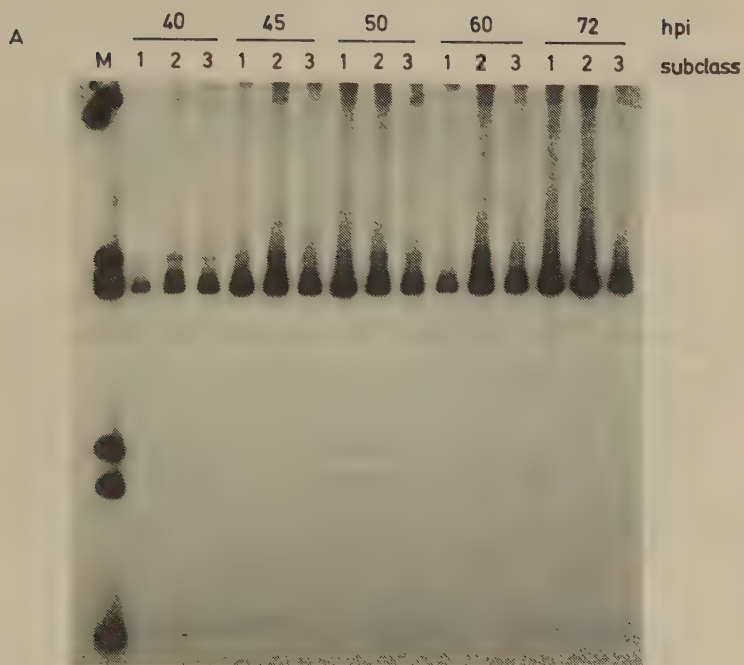
A. Die T-Antigen-Subklassen wurden zu den angegebenen Zeiten (hpi) nach Infektion isoliert. Proben von je 0.1 ml der jeweiligen Subklasse (Spur 1 - 5 S; Spur 2 - 7 S; Spur 3 - 14 S) wurden in einem "Target-bound Assay" mit pSV-wt DNA eingesetzt.

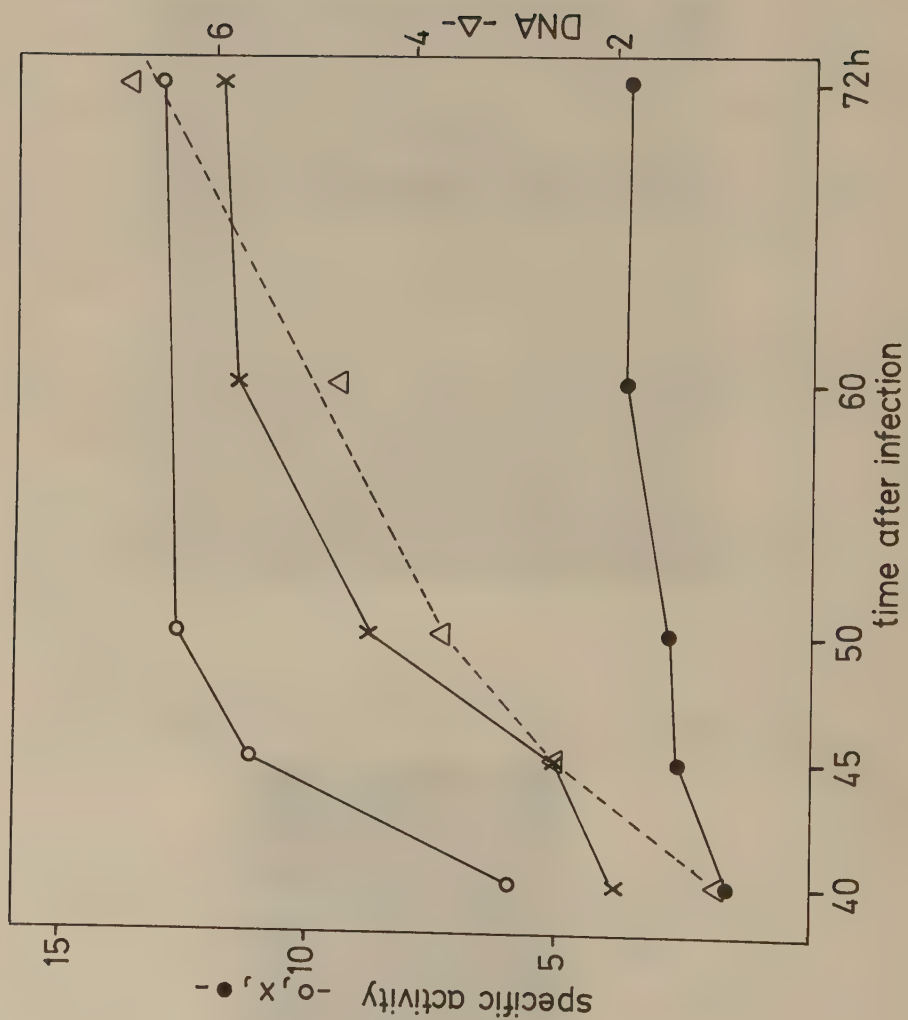
Marker (M): 12.5 ng HindIII-geschnittene pSV-wt DNA

B. In einem parallel zu A. durchgeführten Experiment zu den angegebenen Zeiten wurde die neu synthetisierte SV40-DNA nach Hirt (1967) isoliert, durch BamHI-Verdau linearisiert und anschließend durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert. BamHI-geschnittene pSV-wt DNA diente als Marker (M).

C. Die DNA-Fragmente wurden aus dem Gel von A. geschnitten, in Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und in einem Szintillationszählgerät gezählt. Die T-Antigen-Menge von jeder Subklassen-Probe wurde durch Immun-Dot-Blot-Analyse (Biotin-Streptavidin-System) ermittelt und zueinander in Bezug gesetzt.

Die Zerfälle pro Minute, die pro T-Antigen-Einheit (spezifische Aktivität) gebunden waren, wurden für jede Subklasse (o - 5 S; x - 7 S; ● - 14 S) und zu jedem Zeitpunkt nach Infektion berechnet. Die Menge der neu synthetisierten SV40-DNA zu den jeweiligen Zeiten erfolgte durch densitometrische Auswertung aus dem Gel von B (Abb. s. nächste Seiten).





densitometrischer Messung ermittelt. Die Kombination dieser Ergebnisse diente dazu, die spezifische DNA-Bindungsaktivität als Funktion der Zeit nach Infektion zu bestimmen.

Zeitlich parallel wurde von der noch verbleibenden dritten TC7 Platte die Menge der viralen SV40-DNA, die nach der entsprechenden Infektionszeit vorhanden war, nach Hirt (1967) präpariert. Nach elektrophoretischer Auftrennung konnte die neugebildete SV40-DNA durch densitometrische Messung ermittelt werden (Abb. 12B).

Die Ergebnisse zeigen, daß die spezifische Bindungsaktivität des monomeren T-Antigens (5 S) zwischen 40 h und 50 h nach Infektionsstart stark ansteigt. Eine ähnlich starke Zunahme der spezifischen Bindungsaktivität zeigt auch das dimere T-Antigen (7 S), allerdings mit einer Zeitverzögerung von etwa 5 h. Hingegen bleibt die spezifische Bindungsaktivität der tetrameren T-Antigen-Fractionen während der verschiedenen Infektionszeiten auf einem relativ niedrigen und annähernd konstanten Wert.

Die Zunahme der spezifischen Bindungsaktivität für monomeres und dimeres T-Antigen mit zunehmender Zeit nach Infektion deutete sich auch in Vorversuchen an (Daten nicht gezeigt). In diesen vorangegangenen Experimenten wurden in entsprechender Weise Infektionen zu Zeitpunkten 32, 36, 39 und 44 h nach Infektion durchgeführt. Die beginnende Zunahme der spezifischen Bindungsaktivität für monomeres und dimeres T-Antigen konnte zwischen 36 h und 39 h nach Infektion beobachtet werden. Das tetramere T-Antigen zeigte auch bei diesen Infektionszeiten keine Zunahme der spezifischen Bindungsaktivität.

Die Zunahme der spezifischen Bindungsaktivität für monomeres (5 S) und dimeres (7 S) T-Antigen ist, wie in Abb. 12C dargestellt, zeitlich gleichgeschaltet mit dem Beginn der viralen DNA-Replikation (Abb. 12B) und damit auch der späten Phase der Infektion.

Die Änderung der spezifischen Bindungsaktivität des monomeren und dimeren T-Antigens muß verursacht werden durch eine Zunahme an DNA-bindungsaktiven Molekülen zu späteren Zeitpunkten (40 h bis 50 h) nach Infektion, da die densitometrisch im Immun-Dot-Blot ermittelten T-Antigen-Mengen von jeder Subklasse in der Umrechnung untereinander egalisiert wurden und somit vergleichbar sind. Außerdem konnte keine signifikante Zunahme der DNA-Bindungsaffinität der T-Antigen-Subklassen während der Infektionszeiten 40 h und 48 h beobachtet werden (Tab. 1).

4.7 Dissoziation der T-Antigen-Oligomere in Gegenwart von EDTA

Montenarh und Henning (1983 a, b) haben berichtet, daß T-Antigen-Oligomere in Gegenwart von 20 mM EDTA zur monomeren Form dissoziieren und daß dieser Vorgang rückgängig gemacht werden kann, wenn man Mg^{2+} -Kationen zugibt. Die DNA-Bindungseigenschaften der Oligomere und der dissoziierten Untereinheiten wurden in diesen Arbeiten nicht verglichen.

Wenn die niedrige spezifische Bindungsaktivität des tetrameren T-Antigens auf die oligomere Struktur zurückzuführen ist, sollte es möglich sein, eine höhere Origin-DNA-Bindungsaktivität für die Folgeprodukte nach Dissoziation in Gegenwart von EDTA zu beobachten. Wenn jedoch eine posttranslatorische Modifikation der Oligomere für die niedrige spezifische Bindungsaktivität verantwortlich ist, sollte eine Dissoziation der Oligomere die Origin-DNA-Bindungsaktivität nicht beeinflussen. Deshalb sollten T-Antigen-Oligomere in Gegenwart von EDTA dissoziiert werden und die nötige Minimalkonzentration an EDTA für eine vollständige Dissoziation bestimmt werden.

^{32}P -phosphatmarkierte T-Antigen-Subklassen, isoliert über einen herkömmlichen Dichtegradienten, wurden einzeln nochmals in üblichen Gradienten aufgetrennt. Parallel wurden die gleichen Subklassen nach Inkubation mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen einzeln in Dichtegradienten, die diesmal kein $MgCl_2$ enthielten, erneut abzentrifugiert.

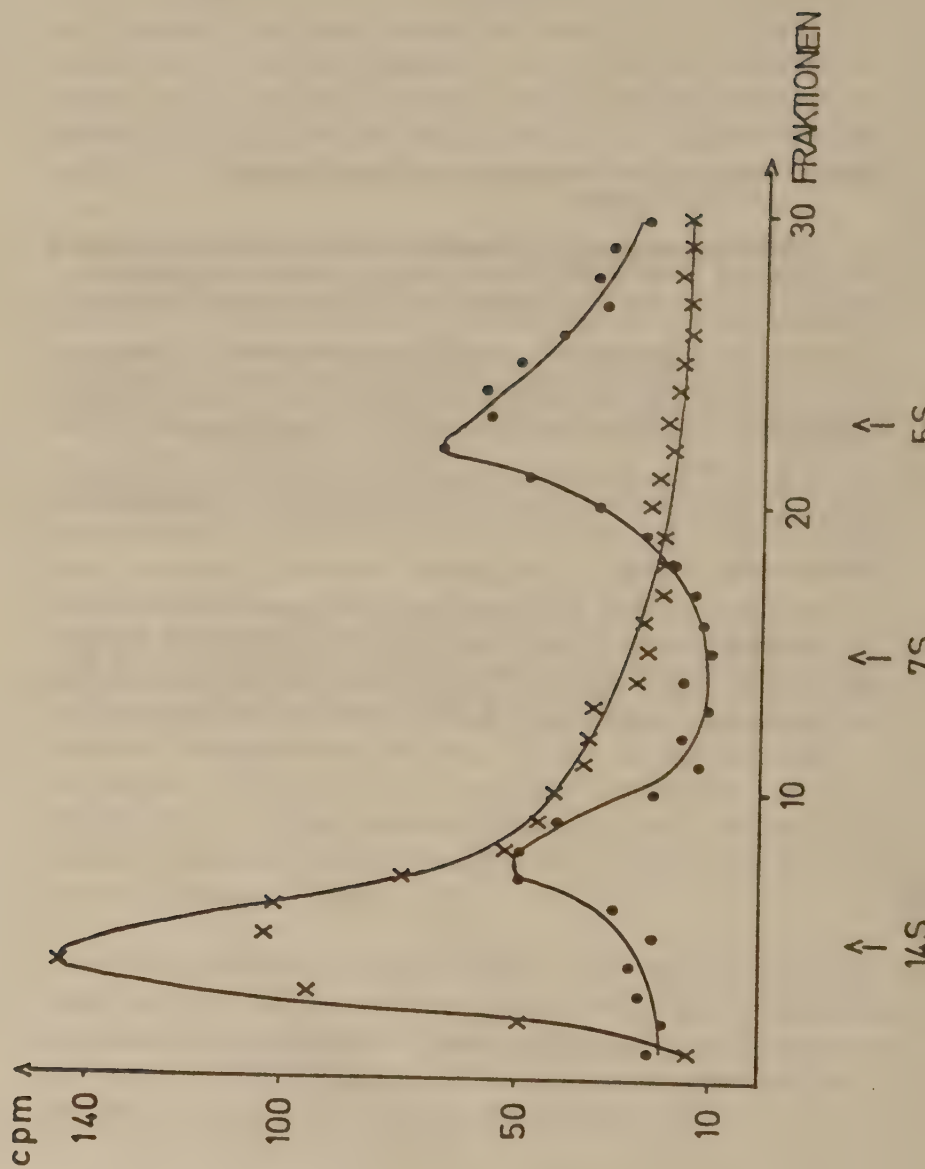
Abb. 13: Dissoziation der tetrameren T-Antigen-Subklasse
unter EDTA-Einfluß

Die mit ^{32}P -markierte tetramere Subklasse aus SV40-infizierten TC7-Zellen (45 hpi) wurde durch eine übliche Dichtegradientenzentrifugation isoliert und erneut in zwei unterschiedlichen Dichtegradienten aufgetrennt.

In dem einem Experiment (●) wurden 100 μl der tetrameren Fraktion mit 100 μl Bindungspuffer B, diesmal ohne MgCl_2 , der zusätzlich 2 mM EDTA enthielt, gemischt, für 30 min bei 0°C vorinkubiert und dann in einem Gradienten, der ebenfalls kein MgCl_2 enthielt, erneut aufgetrennt.

In dem anderen Experiment (x) wurden parallel als Kontrolle 100 μl der tetrameren Fraktion mit 100 μl des herkömmlichen Bindungspuffers B (mit MgCl_2) gemischt, ebenfalls vorinkubiert und in einem üblichen Gradienten aufgetrennt.

Die fraktionierten Proben quer durch beide Gradienten wurden mit Pab 108 immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die T-Antigen-Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten und die ermittelten cpm-Werte graphisch dargestellt. Mitgeführte Marker erlaubten die Zuordnung der gefundenen Subklassen (Abb. s. nächste Seite).



Die Verteilung von T-Antigen in jedem Gradienten wurde durch Immunpräzipitation mit Pab 108 und SDS-PAGE bestimmt. Jede der Subklassen war in den üblichen 0.5 mM $MgCl_2$ -enthaltenden Dichtegradienten stabil, wie es auch schon Gidoni et al. (1982) beobachtet hatte. Die monomere Fraktion nach EDTA-Behandlung zeigte keine Abweichung von der Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Nach Auftrennung der mit 1 mM EDTA-behandelten dimeren Fraktion fand sich sowohl dimeres als auch monomeres T-Antigen (Daten nicht gezeigt). Eine Konzentration von 1 mM EDTA war bereits ausreichend, um eine nahezu vollständige Dissoziation von oligomerem T-Antigen in die monomere Form zu bewirken (Abb. 13).

4.8 Einfluß von $MgCl_2$ bzw. EDTA auf die Origin-DNA-Bindungsaktivität der T-Antigen-Subklassen

In diesen Experimenten sollte untersucht werden, inwieweit $MgCl_2$ bzw. EDTA einen Einfluß auf die DNA-Bindung ausüben. Die T-Antigen-Subklassen wurden zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion präpariert, jedoch in Gradienten, die kein $MgCl_2$ enthielten.

Je 100 μ l jeder Subklasse wurden in den Versuchen eingesetzt. Die Experimente wurden auf zwei Arten durchgeführt.

Im ersten Fall wurden die T-Antigen-Subklassen mit unterschiedlichen Mengen EDTA für 30 min bei 0°C vorinkubiert, um eine Dissoziation der Oligomere in Untereinheiten bereits vor der Immunpräzipitation und dem DNA-Bindungsvorgang zu erreichen (Abb. 14).

Im zweiten Fall wurden die T-Antigen-Subklassen wie üblich immunpräzipitiert und die T-Antigen-Antikörper-Komplexe erst vor der DNA-Bindung bei unterschiedlichen EDTA-Konzentrationen in Bindungspuffer B für 30 min bei 0°C inkubiert (Daten nicht gezeigt).

In beiden Fällen erfolgte die Bindung an die pSV-wt DNA, die im Überschuß vorlag. Die Banden der gebundenen DNA-Fragmente

Abb. 14: Einfluß von verschiedenen EDTA- und MgCl_2 -Konzentrationen auf die DNA-Bindung

A. Die T-Antigen-Subklassen wurden zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion in Saccharose-Dichtegradienten, die kein MgCl_2 enthielten, aufgetrennt. Die T-Antigen-Mengen in jeder Subklasse wurden in einer Dot-Blot-Analyse bestimmt. Dabei verhielt sich das Verhältnis von 5 S : 7 S : 14 S wie 1 : 2 : 4.

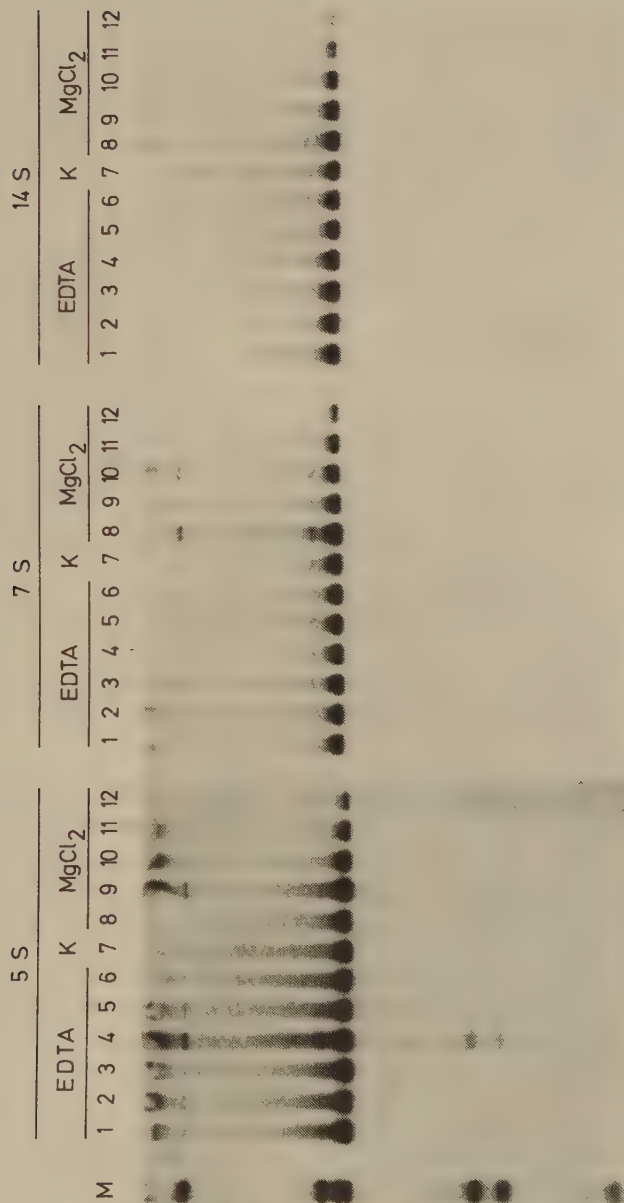
Je 100 μl wurden mit Bindungspuffer A, der ebenfalls ohne MgCl_2 war, im Verhältnis 1 : 1 gemischt, auf die angegebenen Konzentrationen an EDTA bzw. MgCl_2 gebracht und für 30 min bei 0°C inkubiert, bevor der "Target-bound Assay" mit pSV-wt DNA durchgeführt wurde. Als Kontrolle (K) in Spur 7 wurden T-Antigen-Subklassen, die in einem herkömmlichen Dichtegradienten aufgetrennt wurden, aufgetragen. Als Marker (M) diente 12.5 ng HindIII-geschnittene pSV-wt DNA.

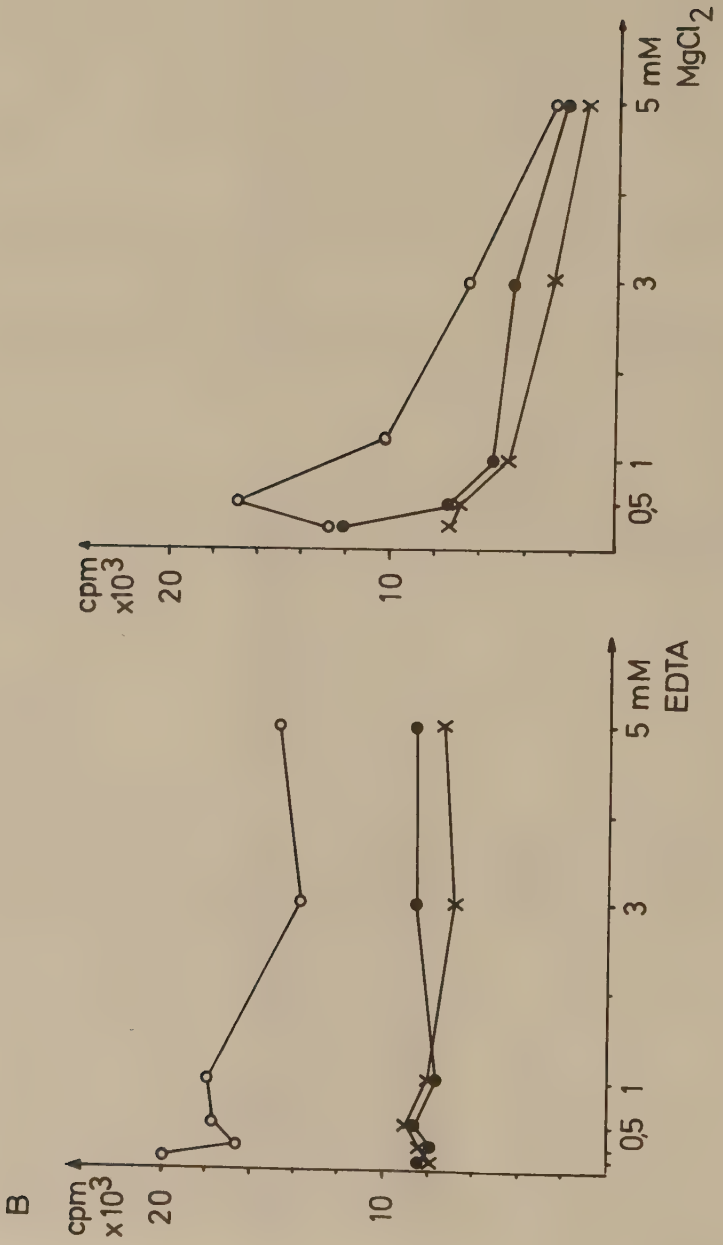
1 - 0.1 mM EDTA	7 - Kontrolle (K)
2 - 0.25 mM "	8 - 0.25 mM MgCl_2
3 - 0.5 mM "	9 - 0.5 mM "
4 - 1.0 mM "	10 - 1.0 mM "
5 - 3.0 mM "	11 - 3.0 mM "
6 - 5.0 mM "	12 - 5.0 mM "

B. Origin-DNA-Bindungsaktivität der T-Antigen-Subklassen als Funktion der EDTA- bzw. MgCl_2 -Konzentration: Das Experiment von A. ist hier graphisch dargestellt. Die gebundenen Origin-DNA-Fragmente wurden aus den Gelen ausgeschnitten und die cpm-Werte ermittelt.

Symbole: o - 5 S; x - 7 S; ● - 14 S
(Abb. s. nächste Seiten)

A





wurden aus den Gelen ausgeschnitten und die darin enthaltene Radioaktivität gemessen. Mit beiden Methoden wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die DNA-Bindung der drei Subklassen bei einer Konzentration von 0.5 mM EDTA war gleich oder etwas größer als in der Kontrolle K (Abb. 14). Die Bindung von monomeren T-Antigen (5 S) nahm bei zunehmender EDTA-Konzentration leicht ab. Die Origin-DNA-Bindung der dimeren (7 S) und der tetrameren (14 S) Fraktionen war in dem untersuchten Konzentrationsbereich kaum beeinflusst (Abb. 14B). Eine Dissoziation unter dem Einfluß von EDTA erhöhte somit nicht die DNA-Bindungsaktivität der neu gebildeten Untereinheiten.

Nach demselben Prinzip wurde auch in den Versuchen mit $MgCl_2$ verfahren. Die Origin-DNA-Bindung des Monomers war optimal mit 0.5 mM $MgCl_2$ im Ansatz und fiel stark ab bei höheren $MgCl_2$ -Konzentrationen. Dimer und Tetramer hingegen wiesen bei niedrigen $MgCl_2$ -Konzentrationen (0.25 mM) eine gute DNA-Bindung auf, die dann ebenfalls bei höheren Konzentrationen stark abfiel (Abb. 14B).

4.9 Einfluß verschiedener Metallkationen auf die DNA-Bindung

In diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob, neben $MgCl_2$, auch andere Kationen das DNA-Bindungsverhalten beeinflussen.

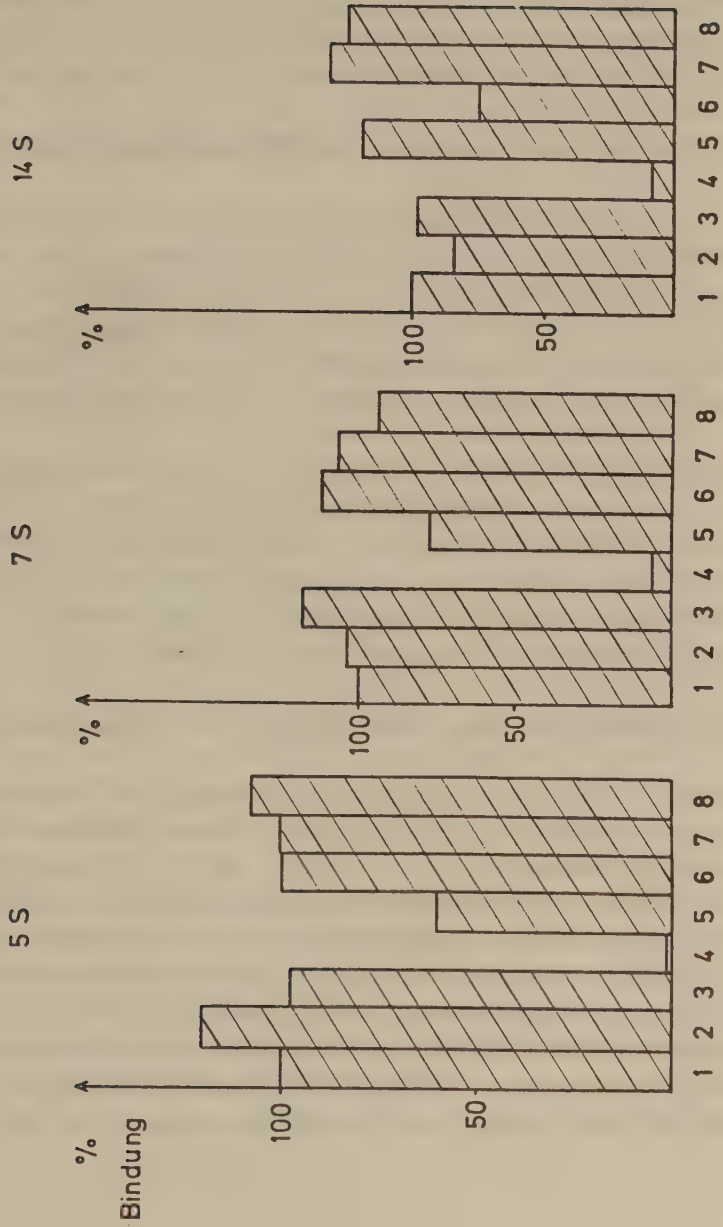
Hierzu wurden T-Antigen-Subklassen zum Zeitpunkt 40 h nach Infektion aus TC7-Zellen präpariert und immunpräzipitiert. Vor der DNA-Bindung wurde zu den Aliquotes der Subklassen in Bindungspuffer B die jeweilige Menge an Metallsalzlösung zugegeben, so daß deren Endkonzentration 5 mM betrug. Der pH-Wert des Bindungspuffers wurde überprüft. Die Proben wurden für 30 min bei 0°C inkubiert, bevor die Bindung an die pSV-wt DNA für 2 h erfolgte. Die gebundenen DNA-Fragmente wurden, wie bereits beschrieben, analysiert (Abb. 15).

Abb. 15: Einfluß verschiedener Metallkationen auf die DNA-Bindung der T-Antigen-Subklassen

Je 100 μ l jeder T-Antigen-Subklasse wurden immunpräzipitiert, in Bindungspuffer B aufgenommen und für 30 min bei 0°C inkubiert. Zu den Proben wurden Metallsalz-Lösungen zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 0°C erfolgte die DNA-Bindung für 2 h bei 0°C an die pSV-wt DNA. Die Proben wurden in einer 2%igen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die gebundenen Origin-DNA-Fragmente aus den Gelen ausgeschnitten und mit einem Szintillationsmeßgerät gezählt. Die DNA-Bindungen wurden in einem Balkendiagramm mit dem 100%-Wert der Kontrolle (ohne Metallsalzbehandlung) verglichen (Abb. s. nächste Seite).

In den einzelnen Spuren wurden folgende Salze mit zur Vorinkubation verwendet:

- | | |
|---------------------|-------------------------------|
| 1 - Kontrolle | 5 - CaCl_2 |
| 2 - NiCl_2 | 6 - MnCl_2 |
| 3 - CoCl_2 | 7 - Na_2MoO_4 |
| 4 - CuCl_2 | 8 - ZnCl_2 |



Bei der Verwendung von CuCl_2 ist für alle drei Subklassen keinerlei DNA-Bindung mehr erkennbar. Alle anderen untersuchten Kationen (Abb. 15) haben in dieser Konzentration (5 mM) auf die DNA-Bindung keinen Einfluß und sind mit der Kontrolle durchaus vergleichbar.

4.10 Reinigung des T-Antigens mit der Affinitätschromatographie

Da in allen vorangegangenen Experimenten das SV40-T-Antigen aus Zellextrakten gewonnen wurde, konnte die Gegenwart anderer Proteine, die eventuell sogar mit T-Antigen wechselwirken, nie vollständig ausgeschlossen werden. Deshalb sollte nun die Methode der Affinitätschromatographie in unserem Labor etabliert werden und mit deren Hilfe natives T-Antigen in hoher Reinheit zur Verfügung gestellt werden.

Die Reinigung des T-Antigens durch die Affinitätschromatographie wurde von Simanis und Lane (1985) beschrieben und sollte die methodische Grundlage für die folgenden Untersuchungen sein. Da das SV40-T-Antigen in TCT-Zellen seine eigene Expression reprimiert, sollten auch andere T-Antigen-Expressionssysteme getestet werden, um möglichst hohe Konzentrationen von gereinigtem T-Antigen zu erreichen.

4.10.1 Affinitätschromatographische Reinigung des T-Antigens aus COS-1

Da diese transformierte Zelllinie nur 1-2 μg T-Antigen pro Platte ($\varnothing$ 145 mm; 1×10^7 Zellen) erbringt, wurden 120 konfluent bewachsene Zellkulturplatten in diesem Experiment eingesetzt (ca. $1,2 \times 10^9$ Zellen). Die Zellen wurden in 50 ml Lysis-Puffer aufgenommen und das Lysat bei 4°C über die beiden Vorreinigungssäulen und anschließend über die, mit Antikörper gekoppelte, Säule geleitet. Das T-Antigen wurde eluiert (pH 11,0). Von jedem Schritt der Chromatographie und der Elution wurden Proben genommen und je 1 μl immunologisch in einer Dot-Blot-Analyse auf T-Antigen getestet. Das Elutionsprofil zeigte leider keinen scharf abgegrenzten Gipfel, sondern einen breiten Elutionsverlauf über viele Fraktio-

nen (20-30 ml). Um das T-Antigen auf Kontamination mit anderen Proteinen zu testen, wurden willkürlich Proben im gesamten Elutionsprofil ausgewählt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Silberfärbung (Wray et al., 1981) analysiert (Abb. 16A). Um das T-Antigen spezifisch nachzuweisen, wurde von einem parallel angefertigten Gel ein Western-Blot mit anschließender Immuno-Färbung durchgeführt (Abb. 16B).

In allen Proben im Western-Blot ist nur eine Bande im Bereich von 90 kD zu sehen. Durch die Verwendung des monoklonalen Antikörpers Pab 108 ist der Beweis erbracht, daß es sich bei dieser Bande tatsächlich um T-Antigen handelt. Vergleicht man nun die T-Antigen-Menge im Zellysat mit der größten Menge T-Antigen in den Eluatproben, so wird eine Anreicherung von T-Antigen um mindestens einen Faktor 10-20 deutlich. Spur 3, in der der Zellextrakt nach Durchlaufen der Affinitätschromatographiesäule aufgetragen ist, zeigt außerdem, daß ein Teil des T-Antigens nicht an die Säule gebunden hat (ca. 10%). Die Bestimmung des Proteingehaltes in jeder Fraktion erfolgte durch den Bio-Rad Protein Assay. Für das Eluat mit der höchsten T-Antigen-Konzentration wurde ein Proteingehalt von 25 µg/ml festgestellt. Die tatsächliche T-Antigen-Menge dürfte etwas niedriger liegen, da sowohl in der SDS-PAGE (Abb. 16A) als auch im Western-Blot (Abb. 16B) zusätzliche Banden von geringer Stärke sichtbar sind. Bei der Verwendung neuer noch unbenutzter Säulen, wie hier in diesem Experiment, wurde trotz Vorelution ein "Bluten" der Säule beobachtet, d. h. kleine Mengen des Antikörpers wurden miteluiert (Abb. 16A, Spuren 4 und 5). Eine weitere Möglichkeit für das Auftreten dieser schwachen Banden besteht in einem proteolytischen Abbau des T-Antigens. Auch ist an eine unspezifische Bindung von Proteinen an den monoklonalen Antikörper Pab 419 zu denken (pers. Mitteilung von I. Dornreiter). Bei der Bande im Größenbereich von ca. 65 kD, die in allen Eluatproben zu erkennen ist, handelt es sich vermutlich um eine Keratin-Bande (Ochs, 1983; Tasheva and Dessev, 1983; Heukeshoven and Dernick, 1988).

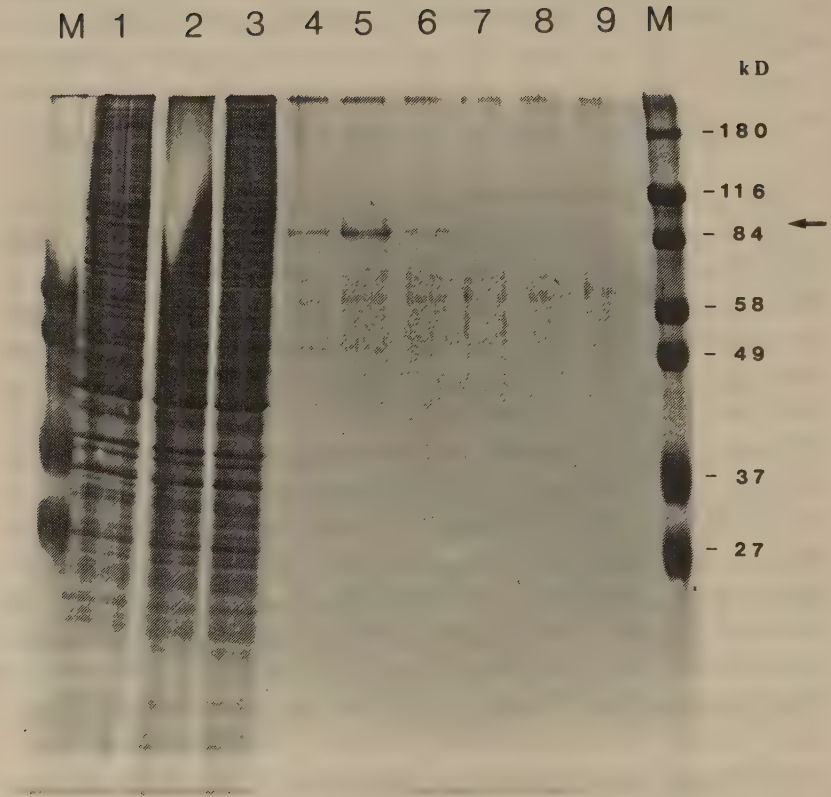


Abb. 16A: Reinigungsexperiment von T-Antigen aus COS-1-Zellen durch die Affinitätschromatographie

Die Proben wurden in einer 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber angefärbt (Wray et al., 1981).

- M = 10 μ l vorgefärbte Markerproteine
- 1 = 50 μ l Zellysatz
- 2 = 50 μ l Zellysatz nach der Vorreinigung
- 3 = 50 μ l Zellysatz nach Bindung an die Affinitätssäule
- 4-9 = je 50 μ l willkürlich ausgewählte Proben aus dem breiten Elutionsprofil, die in der Dot-Blot-Analyse positiv waren

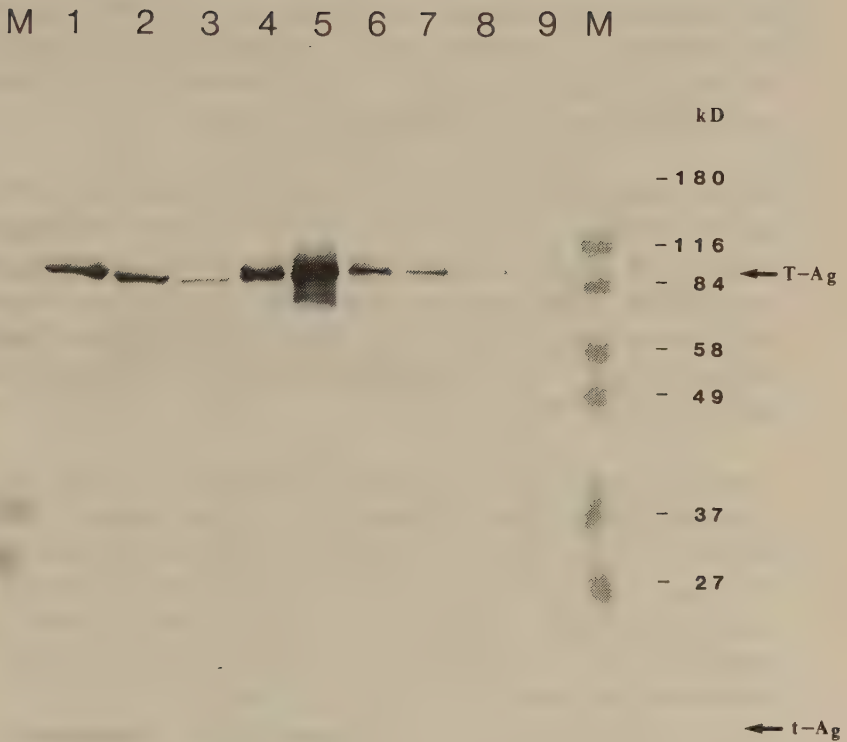


Abb. 16B: Western-Blot, angefärbt mit dem ProtoBlot-System

Als erster Antikörper wurde Pab 108 verwendet. Die einzelnen Spuren sind identisch mit den aufgetragenen Proben in Abb. 16A.

Die theoretische Menge an T-Antigen im ursprünglichen Ausgangslysat lag zwischen ca. 120-240 μg . Wenn man nun die T-Antigen-Mengen in den erhaltenen Eluatfraktionen addiert, so wurden ca. 180-200 μg gefunden; dieses Ergebnis entspricht trotz der festgestellten leichten Verunreinigungen einer relativ guten Ausbeute.

Die biochemische Aktivität des reinen T-Antigens mußte noch bewiesen werden. Dazu wurde ein "Target-bound Assay" mit stichprobenweise gewählten Proben durchgeführt (Abb. 17). Vergleicht man im Western-Blot (Abb. 16B) die T-Antigen-Menge im Zellysat mit der T-Antigen-Menge in der konzentriertesten Elutionsfraktion, so muß im DNA-Bindungsexperiment festgestellt werden, daß ein Teil des T-Antigens nach der Elution seine Aktivität verloren hat.

In einem analogen Experiment wurde im Gegensatz zu Simanis und Lane (1985), die mit einem pH-Sprung das T-Antigen eluierten, nun versucht das T-Antigen mit einem Ionenstärke-Sprung von der Säule zu lösen. Dazu wurde für die Elution 3.5 M MgCl_2 in 50 mM Tris-HCl pH 7.0 verwendet. Die Proben wurden über Nacht gegen den DNA-Bindungspuffer B dialysiert und in einem "Target-bound Assay" auf ihre DNA-Bindungsaktivität überprüft (Abb. 18). Das T-Antigen läßt sich mit 3.5 M MgCl_2 sehr gut von der Säule eluieren, auch ist das Elutionsprofil etwas schmaler (Daten nicht gezeigt). Das T-Antigen zeigt im "Target-bound Assay" ein gutes Bindungsvermögen. Jedoch birgt diese Art der Elution einen großen Nachteil. Bei der Dialyse vergrößert sich das Probenvolumen mindestens auf das Doppelte; dadurch verringert sich die T-Antigen-Konzentration ganz erheblich. Trotz der Verdünnung des T-Antigens scheint der Aktivitätsverlust geringer zu sein, als bei der Elution mit pH 11.0. Wenn das T-Antigen in ausreichend hoher Konzentration gereinigt werden könnte, wären die Nachteile der MgCl_2 -Elution tolerierbar.

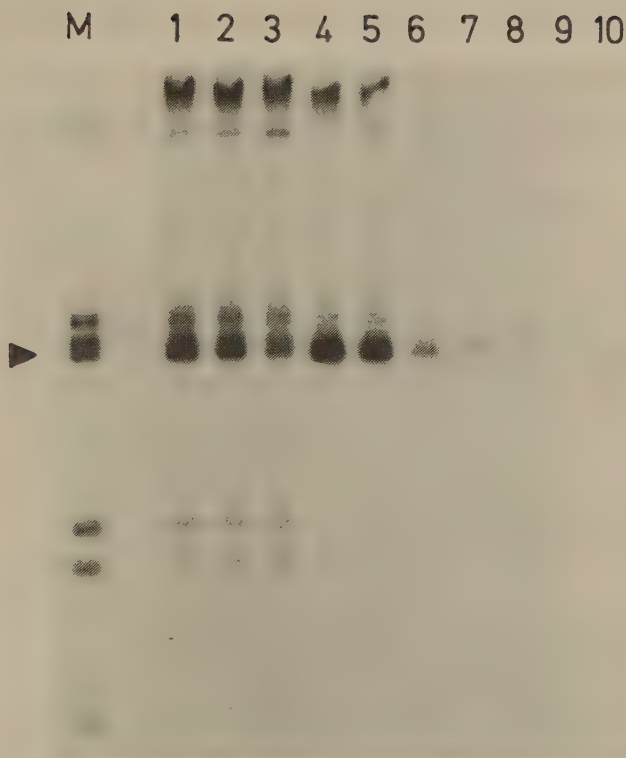


Abb. 17: "Target-bound Assay" mit T-Antigen aus der Affinitätschromatographie

Das T-Antigen wurde mit 20 mM Triethylamin, 10% Glycerin pH 11.0 eluiert und in einem Bindungsexperiment mit pSV-wt DNA eingesetzt. Als Marker (M) dienen 12.5 ng dieser DNA. Von jeder Probe wurden 100 μ l verwendet.

- 1 = COS-1 Extrakt
- 2 = COS-1 Extrakt nach Vorreinigung
- 3 = COS-1 Extrakt nach Bindung an die Säule
- 4 = Eluatprobe mit höchster T-Antigen-Konzentration
- 5-10 = willkürlich ausgewählte Proben aus dem Elutionsprofil

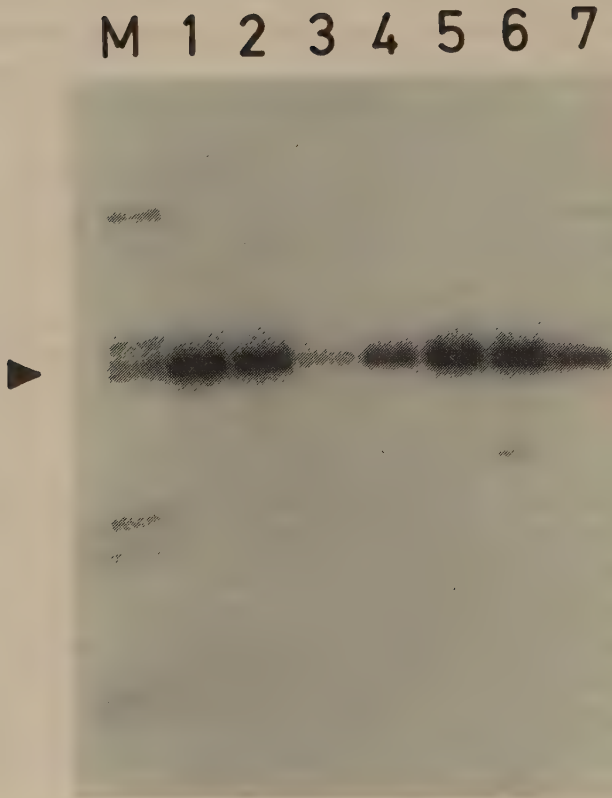


Abb. 18: "Target-bound Assay" mit T-Antigen: Elution mit 3.5 M MgCl_2 , 10% Glycerin pH 7.0

Die Dialyse der Proben erfolgte gegen Bindungspuffer B. Das Experiment wurde mit pSV-wt DNA (0.25 ng) durchgeführt, diese DNA diente auch als Marker (M, 12.5 ng HindIII-geschnitten). Es wurden jeweils 100 μl der Fraktionen eingesetzt.

- 1 = COS-1 Zelllysate
- 2 = COS-1 Zelllysate nach Vorreinigung
- 3 = COS-1 Zelllysate nach Bindung an die Säule
- 4-7 = willkürlich ausgewählte Proben des Eluates, die "Dot-Blot-positiv" waren

Da die Gewinnung des T-Antigens aus COS-1-Zellen auf Dauer zu material- und zeitaufwendig und die T-Antigen-Ausbeute zu niedrig war, sollten auch andere mögliche T-Antigen-Expressionssysteme getestet werden.

4.1.2 Reinigung des T-Antigens aus mit Ad5SVRII5 infizierten 293-Zellen

In entsprechender Weise zu den vorangegangenen Versuchen sollte nun T-Antigen aus 293-Zellen isoliert werden, die mit Ad5SVRII5 infiziert waren (Stillman and Gluzman, 1985). Dieser rekombinante Adenovirus enthält die codierende Region für das SV40-T-Antigen. Die T-Antigen-mRNA wird von dem starken "Major late promoter" des Ad5 (Solnick, 1981) transkribiert und enthält auch die späten "Leader"-Sequenzen I, II und ca. die Hälfte von III (Logan and Shenk, 1984). In dem rekombinanten Virus sind die frühen Regionen 1 und 3 deletiert, wobei nur die Region 1 für die Vermehrung von Ad5 in Zellkultur erforderlich ist. Deshalb kann sich dieser Virus nur in der permissiven humanen Zelllinie 293 vermehren, da diese die Proteine der EI-Region produziert (Graham et al., 1977).

In diesen Experimenten wurden ca. 15 Zellkulturflaschen (80 cm²) mit Ad5SVRII5 für 40 h infiziert. Nach Ernte der Zellen erfolgte, wie beschrieben, die Reinigung des T-Antigens durch die Affinitätschromatographie. Es wurden dieselben Versuche durchgeführt wie mit T-Antigen aus COS-1-Zellen. Die Ergebnisse stimmten überein. T-Antigen konnte nun in deutlich größerer Menge (insgesamt 550 µg) und in wesentlich höheren Konzentrationen (bis 80 µg/ml) mit 20 mM Triethylamin, 10% Glycerin pH 11.0 von der Säule eluiert werden. Das Ergebnis konnte sogar in einer nicht so empfindlichen Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE gezeigt werden (Abb. 19). Auch hier waren wieder schwache Banden von Begleitprodukten erkennbar. Ein durchgeführter "Target-bound Assay" bestätigte nochmals die früher gemachte Beobachtung, daß ein Teil des T-Antigens das DNA-Bindungsvermögen für die pSV-wt DNA

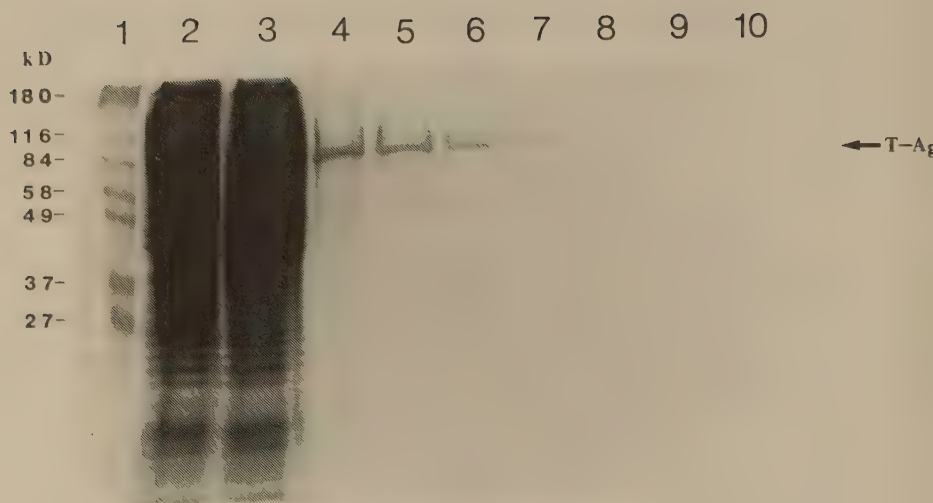


Abb. 19: T-Antigen-Reinigung aus 293-Zellen durch die Affinitätschromatographie

Die Proben wurden in einer 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Je 100 μ l der Proben wurden aufgetragen.

- 1 - 10 μ l vorgefärbte Markerproteine
- 2 - 293 Zelllysate
- 3 - 293 Zelllysate nach Bindung an die Affinitätsäule
- 4-10 - willkürlich gewählte Proben des pH 11.0 Eluates, die "Dot-Blot-positiv" waren

verloren hatte (Daten nicht gezeigt). Prinzipiell lassen sich mit diesem Expressionssystem wesentlich bessere Ausbeuten an T-Antigen bei stark verringertem Material- und Zeitaufwand erreichen.

Die Ausbeute wurde von Stillman und Gluzman (1985) mit 400-800 μg T-Antigen bei 3×10^8 Zellen angegeben. Die in dieser Arbeit erreichte Ausbeute lag somit höher, da mit nur ca. $1-1.5 \times 10^8$ Zellen ungefähr 550 μg T-Antigen gewonnen wurde.

4.10.3 Reinigung des T-Antigens aus mit 373T-Baculovirus infizierten Sf9-Insektenzellen

Die Verwendung des rekombinanten Baculovirus Autographa californica für die Expression von, normalerweise in Säugerzellen produzierten, Proteinen in Insektenzellen ist seit einiger Zeit bekannt und akzeptiert (Smith et al., 1983; Summers and Smith, 1987; Luckow and Summers, 1988). Ein sehr hoher Grad an Fremdproteinsynthese kann erreicht werden, wenn man sich, wie in diesem System, den starken Promoter des AcNPV-Polyhedrin-Genes zu Nutze macht (Hooft van Iddenkinge et al., 1983). Zur Gewinnung großer Mengen T-Antigen konstruierte R. E. Lanford (1988) rekombinante Baculoviren, in denen das Gen des SV40-T-Antigens unter der Kontrolle dieses starken Promoters steht.

Mit einem dieser Baculoviren, dem 373T-Virus wurden 15 Zellkulturflaschen Sf9-Zellen (ca. 1.5×10^8 Zellen) für 40 h bei 28°C infiziert. Die infizierten Zellen wurden wie beschrieben behandelt und das T-Antigen über die Affinitätschromatographiesäule gereinigt. Wieder wurden dieselben Experimente durchgeführt und analoge Ergebnisse erhalten (Daten nicht gezeigt). Hier konnten ca. 480 μg T-Antigen mit einer maximalen Konzentration von bis zu 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erreicht werden, so daß auch dieses Expressionssystem zur Gewinnung von T-Antigen als sehr geeignet erscheint.

Nach einer Schätzung von Lanford (1988) sollten bei Verwendung von 2×10^9 infizierten Zellen nach 48 h 20-30 mg erhalten werden. Nach Umrechnung dieses Ergebnisses auf die hier verwendete Zellzahl hätte man eine Menge von ca. 1-2 mg gereinigtes T-Antigen erhalten müssen. Die tatsächlich gefundene Ausbeute war deutlich geringer. Die Kapazität der Säule wurde überschritten und dadurch nicht das gesamte T-Antigen gebunden. Das gebundene T-Antigen konnte mit beiden Elutionspuffern nicht vollständig von der Säule eluiert werden. Die Infektionszeit um 8 h kürzer, als später in der Literatur angegeben wurde. Dadurch könnte ebenfalls die niedrigere T-Antigen-Ausbeute erklärt werden. Die Abweichungen vom Literaturwert können auch auf eine unterschiedliche Multiplizität der Infektion und auf die Verwendung eines anderen Mediums und Serums in der Zellkultur zurückgeführt werden.

Die Reinigung des T-Antigen über die Affinitätschromatographie hat sich als sehr effektive Möglichkeit dargestellt, nahezu hochreines T-Antigen zu gewinnen. Die angesprochenen Probleme zeigen, daß diese Methode noch optimiert werden muß, um biologisch hochaktives T-Antigen auch in höheren Konzentrationen zu erhalten.

Eine Auftrennung des eluierten T-Antigens in seine Subklassen durch Dichtegradientenzentrifugation wurde nicht durchgeführt. Nach Lanford (1988) ist das aus den Insektenzellen gewonnene SV40-T-Antigen auch in seinen Subklassen voll mit den aus Säugerzellen erhaltenen T-Antigen-Subklassen vergleichbar.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß das lösliche T-Antigen aus lytisch infizierten TCT-Zellen in drei Subklassen existiert, die sich durch Dichtegradientenzentrifugation voneinander trennen lassen:

eine 5 S Form, die monomeres T-Antigen darstellt,

eine 14 S Form, die tetrameres T-Antigen darstellt, und

eine 7 S Form, die entweder einem Dimer entspricht oder aber auch ein modifiziertes Monomer sein könnte. Frühere Ergebnisse (S. Thompson, Diplomarbeit 1984) zur DNA-Bindungskinetik und Stöchiometrie der 7 S Form sprechen für die Annahme, daß das 7 S T-Antigen tatsächlich ein Dimer darstellt.

Neu synthetisiertes T-Antigen erscheint zuerst als monomeres T-Antigen und dient als Vorstufe für die tetramere Form, die später erscheint ("Pulse-Chase"-Experimente). Die Oligomerisierung von monomerem T-Antigen zur tetrameren Form geschieht deutlich schneller zu frühen Zeitpunkten nach Infektion als zu späten Zeitpunkten. Dieser Effekt wurde ebenfalls von Wachter et al. (1985) beschrieben.

Der Hauptteil des 7 S T-Antigens ist aller Wahrscheinlichkeit nach kein Zwischenprodukt auf dem Weg der Oligomerisierung von monomerem zu tetramerem T-Antigen, da in den "Pulse-Chase"-Experimenten selbst in den kurzen "Chase"-Perioden kein dimeres T-Antigen nachgewiesen werden konnte. Daß das dimere T-Antigen ein Zwischenprodukt mit einer sehr kurzen Halbwertszeit darstellt, ist eher unwahrscheinlich, da die dimere Form u. a. in Dot-Blot-Analysen mit etwa 25% Anteil an der gesamten T-Antigen-Menge gefunden wurde.

Die tetramere Form scheint in vivo relativ stabil zu sein (Fanning et al., 1981; Gidoni et al., 1982; Scheidtmann et al., 1984), aber auch in vitro in Lösungen mit neutralem pH-Wert, niedrigen Salzkonzentrationen und zweiwertigen Kationen (Dorn et al., 1982; Montenarh and Henning, 1983 a, b; Scheidtmann et al., 1984). Eine Dissoziation des tetrameren T-Antigens kann beobachtet werden, wenn es in Lösungen mit hoher

Ionenstärke (Gidoni et al., 1982; Runzler et al., 1987) vorliegt. Auch in Gegenwart chelatierender Chemikalien oder während chromatographischer Auftrennung (Dorn et al., 1982) erfolgt eine Dissoziation in Untereinheiten. Diese Daten lassen die Hypothese aufstellen, daß ein Teil des hochphosphorylierten tetrameren T-Antigens in vitro und eventuell auch in vivo dissoziiert und dabei 7 S und möglicherweise auch 5 S Formen entstehen. Unter dieser Voraussetzung könnten die 5 S und 7 S Formen jeweils aus einer heterogenen Mischung von neu synthetisiertem T-Antigen und auch aus Dissoziationsprodukten des tetrameren T-Antigens bestehen. Die Verschiedenartigkeit der 5 S und 7 S Subklassen zeigt sich auch in ihrem unterschiedlichen Phosphorylierungsgrad (Scheidtmann et al., 1984) und liefert weitere Hinweise für eine solche Interpretation.

Die Bindungsaffinität jeder T-Antigen-Subklasse für die SV40-DNA wurde ermittelt. Diese wurde durch Bestimmung der gebundenen DNA als Funktion der DNA-Konzentration mit zwei verschiedenen DNA-Proben erhalten. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß alle drei Subklassen ungeachtet ihrer Heterogenität eine ganz ähnliche Affinität für die beiden verwendeten DNA-"Templates" besitzen. Die Dissoziationkonstante K_D , die in dieser Arbeit ermittelt wurde, deckt sich nahezu mit den Ergebnissen von Jones und Tjian (1984) für hochgereinigtes Wildtyp-T-Antigen, aber auch für T-Antigen aus SV40-transformierten mKSA-Mauszellen (Hinzpeter et al., 1986). Eine um den Faktor 10 niedrigere Affinität, die für gereinigtes T-Antigen von Dixon und Nathans (1985) angegeben wurde, beruht auf der Annahme, daß das gesamte Protein in der Lage ist, Origin-DNA zu binden. Diese Annahme kann so nicht gültig sein, wie die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen. Auch steht diese Annahme im Widerspruch zu den Ergebnissen von Scheller et al. (1982), Hinzpeter et al. (1986) und Schirmbeck und Deppert (1988).

Die spezifische Aktivität wurde für jede Subklasse als Menge von SV40-DNA, die spezifisch pro immunreaktiver T-Antigen-Einheit gebun-

den wurde, ermittelt. Die Ergebnisse demonstrieren deutlich, daß die spezifische Aktivität der Origin-DNA-Bindung für die beiden verwendeten DNA-Proben im Falle des monomeren (5 S) und dimeren (7 S) T-Antigens am größten und für das tetramere (14 S) T-Antigen am niedrigsten ist (Abb. 8, 9, 11, 12). Eine Bemerkung erscheint hier notwendig. Obwohl der Antikörper Pab 108 das T-Antigen quantitativ immunpräzipitiert, brauchen nicht alle vier der N-terminalen Epitope für die Antikörper-Bindung in jedem Tetramer zur Verfügung zu stehen. Dadurch kann die Menge an immunreaktivem T-Antigen in der 14 S Form bis um das Vierfache unterschätzt werden. Deshalb müssen die Ergebnisse für die spezifische Aktivität des tetrameren T-Antigens als Maximalwerte betrachtet werden.

Die spezifische Bindungsaktivität der 5 S und 7 S T-Antigen-Subklassen erhöhte sich deutlich mit zunehmender Infektionszeit, während die spezifische Bindungsaktivität des 14 S T-Antigens auf einem nahezu konstant niedrigen Wert blieb (Abb. 12). Dieses Ergebnis könnte durch eine Zunahme der Affinität des T-Antigens für die SV40-DNA zu späten Zeitpunkten der Infektion erklärt werden. Jedoch blieb die Affinität der Subklassen für die SV40-DNA zu den Zeitpunkten 40 h und 48 h nach Infektion (Tab. I) nahezu gleich. Deshalb erscheint eine Zunahme der Affinität der T-Antigen-Subklassen zu späten Zeitpunkten der Infektion als unwahrscheinlich. Die beobachtete Änderung der spezifischen Aktivität der 5 S und 7 S Formen läßt sich auf eine Zunahme an DNA-bindungsaktiven T-Antigen-Molekülen zu späten Zeitpunkten der Infektion zurückführen. Hingegen verbleibt innerhalb der tetrameren Subklasse der Anteil an DNA-bindungsaktiven Molekülen in etwa konstant.

Die vorhandenen Daten wurden in einem übersichtlichen Modell zusammengefaßt, das die Oligomerisierung des T-Antigens mit der Origin-DNA-Bindungsaktivität in Zusammenhang bringt (Abb. 20). Das Modell postuliert, daß das neu synthetisierte monomere T-Antigen

(5 S) zwei verschiedene Konformationen annehmen kann. Die eine T-Antigen-Konformation (Hexagon) ist in der Lage die Origin-DNA zu binden, die andere Konformation (Quadrat) bindet nicht an die Origin-DNA. Der Einfachheit halber sind die beiden konformeren T-Antigen-Monomere anteilmäßig gleich dargestellt, wenn es auch als unwahrscheinlich erscheint, daß deren Phosphorylierungsgrad oder andere posttranslationale Modifikationen oder aber auch die Gegenwart von anderen Liganden den mengenmäßigen Anteil der beiden T-Antigen-Konformationen bestimmen (Scheller et al., 1982; Bradley et al., 1984; Scheidtmann et al., 1984; Vogt et al., 1986). Die in dem Modell gezeigte Stöchiometrie ist hier für die Bindung an die pON-wt DNA dargestellt (Ryder et al., 1985). Der kinetische Mechanismus für die Bindung an die Bindungsstellen der DNA ist aber nicht bekannt.

Wie in dem Modell vorgeschlagen, soll tetrameres T-Antigen sich direkt aus einem Teil des neu synthetisierten monomeren T-Antigens zusammensetzen und dann in einer Konformation vorliegen, die nicht in der Lage ist, an Origin-DNA zu binden, solange der tetramere Zustand stabil bleibt. Proteinphosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsreaktionen, aber auch zweiwertige Metallkationen können für die Aufrechterhaltung der Stabilität der tetrameren Form wichtig sein (Baumann and Hand, 1982; Montenarh and Henning, 1983 a, b; Scheidtmann et al., 1984). Eine Dissoziation des Tetramers, die, wie bekannt, unter einer Reihe von Bedingungen vorkommt, führt zu monomeren und dimeren T-Antigen-Subklassen. Unter Einfluß von EDTA erfolgte der Zerfall der tetrameren Subklasse in monomere und dimere Formen, die im DNA-Bindungstest keine gesteigerte Bindungsaktivität aufwiesen (I4A, B). Obwohl im gezeigten Modell für die monomeren und dimeren Formen beide Konformationen möglich sein sollen, könnte starke Ligandenbindung oder Modifikationen die Konformationen fixieren und damit das DNA-Bindungsverhalten beeinflussen.

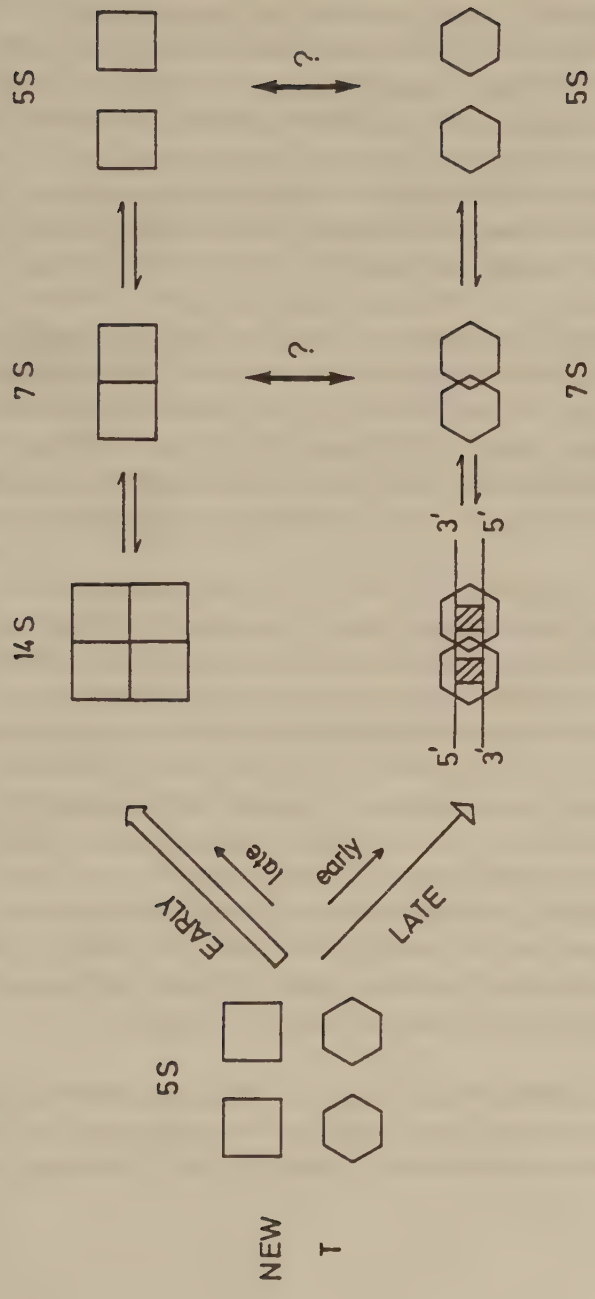
Wie kann nun der Verlauf der Infektion die Verteilung von Monomeren und Dimeren in den jeweiligen Konformationen beeinflussen?

Wie aus der Arbeit von Gidoni et al. (1982) bekannt, ist die Oligomerisierung von neu synthetisiertem T-Antigen aus lytisch infizierten Zellen vollständiger, wenn die virale DNA-Replikation unterbunden ist. Wachter et al. (1985) haben gezeigt, daß die Oligomerisierung von neu synthetisiertem T-Antigen aus lytisch infizierten Zellen wesentlich schneller vor dem Beginn der viralen DNA-Replikation verlief als zu späteren Zeitpunkten der Infektion. Diese Beobachtung konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Auf der Basis dieser Daten kann man spekulieren, daß die Zunahme der spezifischen Aktivität in der Origin-DNA-Bindung, die für monomeres und dimeres T-Antigen beobachtet wurde, mit einer langsameren Oligomerisierungsrate zur tetrameren Struktur einhergeht (Abb. 20). Nachdem die Oligomerisierung durch Unterbrechung der viralen DNA-Synthese (Wachter et al., 1985) verlangsamt werden kann, sollte diese Möglichkeit in weiteren Experimenten genauer studiert werden.

Ein biologischer Sinn könnte sein, daß das tetramere T-Antigen eine Speicherform des DNA-bindungsaktiven monomeren T-Antigens darstellt. Durch schnelle Bildung großer Mengen an monomerem T-Antigen könnte die Produktion von zellulären Proteinen verlangsamt werden. Durch biochemische Reaktionen, wie z. B. Phosphorylierung u. a., könnte eine schnellere Oligomerisierung erreicht werden, die zu hohen Konzentrationen der tetrameren Form im Zellkern führt. Dieses Tetramer bindet nicht an die DNA. Erst wenn genügend tetrameres T-Antigen vorhanden ist, setzen virale DNA-Replikation oder auch andere biologische Prozesse (z. B. Transkription) ein. Vorgänge im Zellkern, die zu einer Dissoziation des Tetramers führen, könnten nun T-Antigen-Subklassen freisetzen, die wieder Bindungsaktivität annehmen. Wenn im Verlauf der Infektion die Produktion von weiterem T-Antigen reprimiert wird, wäre so bereits ein großer Vorrat an Tetrameren vorhanden. Dieses T-Antigen ist dann für eventuell noch unbekannte

Abb. 20: Modell für die Oligomerisierung und Origin-DNA-Bindung der T-Antigen-Subklassen

Neu synthetisiertes monomeres T-Antigen (5 S) kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen. Die eine Form (Hexagon) kann spezifisch Origin-DNA binden. Die andere Form (Quadrat) kann nicht binden, ist aber möglicherweise die 5 S Form, die hauptsächlich zu frühen Zeitpunkten der Infektion zur 14 S Form oligomerisiert. Ein Teil der Tetramere (14 S) kann in monomere (5 S) und dimere (7 S) Subklassen dissoziieren. Dabei können Untereinheiten eventuell beider Konformationen entstehen. Ein größerer DNA-bindungsaktiver Anteil von 5 S und 7 S wurde zu späten Zeitpunkten der Infektion beobachtet. Die Masse eines Dimers oder zweier Monomere bindet an die hier dargestellte pON-wt DNA, die zwei Consensus-Pentanukleotide (gestrichelte Bereiche auf der DNA) enthält. Der Bindungsmechanismus ist aber nach wie vor unbekannt (Ryder et al., 1985; Abb. s. nächste Seite).



Funktionen zu späten Zeitpunkten der Infektion nötig.

Ein solcher Reaktionsweg könnte auch das Vorhandensein des dimeren T-Antigens erklären. Eine andere Möglichkeit wäre, daß das dimere T-Antigen erst auf der DNA aus zwei monomeren Untereinheiten aggregiert und dieser gebildete Komplex nach Ablösung von der DNA als Dimer erhalten bleibt. Dies könnte auch der Grund sein, daß nach Dichtegradientenzentrifugation in allen Dot-Blot-Analysen dimeres T-Antigen mit einem Anteil von ca. 25% gefunden wurde.

Das vorgeschlagene Modell für die biologischen Abläufe in vivo stimmt mit den hier gezeigten Daten überein und bildet so einen nützlichen Rahmen, um die verwirrende Literatur über Eigenschaften der T-Antigen-Subklassen zu integrieren. Außerdem bieten die Ergebnisse dieser Arbeit einen guten Ausgangspunkt für detailliertere strukturelle und biochemische Untersuchungen der T-Antigen-Subklassen.

In den Experimenten mit EDTA wurde beobachtet, daß das tetramere T-Antigen durch diesen Einfluß in Untereinheiten dissoziiert. Da EDTA ein chelatierendes Agens für zweiwertige Kationen ist, könnte dieser Befund darauf hinweisen, daß zweiwertige Kationen an der Aufrechterhaltung der oligomeren Struktur beteiligt sind. Montenarh und Henning (1983 a, b) zeigten, daß durch Zugabe von $MgCl_2$ die Dissoziation der Oligomere rückgängig gemacht werden kann. Ob aber nun tatsächlich Mg^{2+} -Kationen für die Stabilität des tetrameren T-Antigens verantwortlich sind, konnte nicht bewiesen werden.

In Gegenwart von höheren Konzentrationen (5 mM) an Mg^{2+} wurde eine deutliche Abnahme der DNA-Bindung beobachtet. Eventuelle Interaktionen zwischen Protein und Mg^{2+} oder aber zwischen DNA und Mg^{2+} können nicht ausgeschlossen werden.

In Experimenten mit Zn^{2+} -Kationen wurde keine Beeinträchtigung der DNA-Bindung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle beobachtet. T-Antigen besitzt eine vergleichbare Aminosäure-Sequenz

(Cys-X₂-Cys-X₁₁-His-X₂-His), die für "Zinkfinger"-Strukturen in eukaryontischen DNA-bindenden Proteinen postuliert wurde (Berg, 1986; Klug and Rhodes, 1987; Evans and Hollenberg, 1988). Dieser "Zinkfinger"-Bereich liegt außerhalb der DNA-Bindungsdomäne. Austauschreaktionen der Aminosäuren Cys 302 oder Cys 305 durch Serin führten zu einem völligen Verlust der DNA-Bindung (Arthur et al., 1988). Diese Untersuchungen konnten jedoch nicht ausreichend klären, ob hier tatsächlich ein "Zinkfinger" direkt in der Origin-DNA-Bindung involviert ist, oder aber dieser Aminosäureaustausch die Konformation des Proteins drastisch verändert. Deletionsmutanten des T-Antigens, in denen der "Zinkfinger"-Bereich fehlte, behielten die DNA-Bindungsaktivität bei. Diese Ergebnisse zeigen, daß nicht immer "Zinkfinger" für DNA-Wechselwirkungen nötig sind (Frankel and Pabo, 1988, Marx, 1988). Vielleicht ist dieser "Zinkfinger" für die Oligomerisierung wichtig oder an der Aufrechterhaltung der tetrameren Struktur beteiligt. Es wäre sicher lohnend, diese Aussage näher zu untersuchen.

In den Experimenten mit verschiedenen Kationen wurde der vollständige Verlust des DNA-Bindungsverhaltens aller drei T-Antigen-Subklassen durch Cu²⁺-Kationen festgestellt. Dieser Befund ist vollständig unklar. Die Einhaltung des richtigen pH-Wertes wurde kontrolliert. Der beobachtete Effekt kann auch durch den Ionenradius von Cu²⁺-Kationen nicht erklärt werden. Eine Veränderung der Proteinkonformation (z. B. durch Oxidation) oder Interaktionen zwischen Cu²⁺ und der DNA-Bindungsdomäne oder mit der DNA können nicht ausgeschlossen werden. Ob T-Antigen bei dieser relativ hohen Konzentration an Cu²⁺ aggregiert oder präzipitiert kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden und müßte mit gereinigten T-Antigen-Subklassen in weiteren Experimenten mit wesentlich niedrigeren Cu²⁺-Konzentrationen überprüft werden.

In den T-Antigen Reinigungsexperimenten mit der Affinitätschromatographie konnte hoch angereichertes T-Antigen erhalten werden. In den Untersuchungen, in denen T-Antigen sowohl durch pH-Sprung als auch

durch Salz-Sprung von der Säule eluiert wurde, war festgestellt worden, daß ein Teil des T-Antigens seine biologische Aktivität in den DNA-Bindungsexperimenten verloren hatte. Vermutlich sind für diesen Effekt die drastischen Elutionsbedingungen (pH 11.0 oder 3.5 M MgCl_2) verantwortlich. Auch in von Kollegen durchgeführten Experimenten (*in vitro*-Replikation-Assays, Gel-Retention-Assays) zeigte dieses T-Antigen keine biochemischen Aktivitäten mehr.

Somit sind diese Verfahren zur Gewinnung von biologisch aktivem T-Antigen noch nicht voll ausgereift. Ein guter Ansatz für eine Optimierung der T-Antigen-Reinigung wäre die Verwendung von Tresyl-aktivierter Sepharose (Pharmacia) und daran gekoppelt ein monoklonaler Antikörper mit einer niedrigeren Affinität für T-Antigen (z. B. Pab 101). Dadurch kann mit wesentlich milderem pH- oder Salz-Bedingungen das T-Antigen von der Säule eluiert werden und ein biologisch voll aktives T-Antigen, auch in noch höheren Konzentrationen, gereinigt werden (pers. Mitteilung K. Klausning, Konstanz).

Die Expression von T-Antigen in Insektenzellen hatte sich mit dem rekombinanten Baculovirus 373T als geeignet erwiesen. Mit einem weiteren rekombinanten Baculovirus 941T, der unserer Arbeitsgruppe erst seit kurzer Zeit von R. E. Lanford zur Verfügung steht, sollten sich nach Auskunft von Lanford (1988) noch deutlich größere Mengen an T-Antigen gewinnen und isolieren lassen (bis 60 mg pro ca. 10^9 Sf9-Zellen).

Viele der heute noch offenen Fragen zu biochemischen und strukturellen Eigenschaften des T-Antigens werden sich in naher Zukunft mit gereinigten T-Antigen-Subklassen aufklären und die Wirkungsweise dieser Proteine bei der Regulation von Replikation, Transkription und Transformation *in vitro* studieren lassen.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der T-Antigen-Subklassen aus lytisch infizierten Zellen in Bezug auf Oligomerisierung und Origin-DNA-Bindung, sowie die Anreicherung des T-Antigens aus verschiedenen Expressionssystemen über die Affinitätschromatographie.

1. Neu synthetisiertes monomeres T-Antigen (5 S) konnte als Vorstufe für tetrameres T-Antigen (14 S) identifiziert werden. Dimeres T-Antigen (7 S) trat dabei nicht als Zwischenprodukt auf dem Weg zur tetrameren Form auf. Die Oligomerisierung von monomerem T-Antigen zum tetrameren T-Antigen geschah deutlich schneller 24 h nach Infektion als 48 h nach Infektion.
2. Die drei T-Antigen-Subklassen banden qualitativ gleich an pSV-wt DNA und pON-wt DNA. Beide DNA-"Templates" konkurrierten um das angebotene T-Antigen. Dieser Befund deutete darauf hin, daß die Bindungsaffinität des T-Antigens für beide DNAs ähnlich sein muß. Das monomere T-Antigen konnte acht- bis zehnmal mehr an die beiden Origin-DNAs binden als die tetramere Form.
3. Für alle drei T-Antigen-Subklassen wurden ähnliche Dissoziationskonstanten von etwa 0,4 nM für die Bindung an die pSV-wt DNA und die pON-wt DNA festgestellt. Die ermittelten Werte für die Dissoziationskonstanten für 39-40 h bzw. 48 h nach Infektion unterschieden sich kaum voneinander.
4. Die spezifische Aktivität der Bindung an die pSV-wt DNA und die pON-wt DNA war für monomeres und dimeres T-Antigen am größten. Monomeres und dimeres T-Antigen konnte ungefähr fünf- bis achtmal mehr Origin-DNA binden als eine gleiche Menge der tetrameren Form.
5. Die spezifische Bindungsaktivität des monomeren T-Antigens (5 S) stieg zwischen 40 h und 50 h nach Infektionsbeginn stark an. Die

spezifische Bindungsaktivität des dimeren T-Antigens (7 S) erhöhte sich ebenfalls, jedoch mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 5 h. Die spezifische Bindungsaktivität der tetrameren T-Antigen-Subklasse (14 S) blieb auf einem relativ niedrigen und annähernd konstanten Wert während der verschiedenen Infektionszeiten. Die Zunahme der spezifischen Bindungsaktivität für monomeres und dimeres T-Antigen war zeitlich gleichgeschaltet mit dem Beginn der viralen DNA-Replikation und somit auch der späten Phase der Infektion.

6. Eine Konzentration von 1 mM EDTA war bereits ausreichend, um eine nahezu vollständige Dissoziation von oligomerem T-Antigen in die monomere Form zu bewirken.

7. Die Origin-DNA-Bindung der T-Antigen-Subklassen war bei zunehmender EDTA-Konzentration nur wenig beeinflusst. Die Dissoziation der oligomeren Formen unter dem Einfluß von EDTA erhöhte die DNA-Bindungsaktivität der neugebildeten Untereinheiten nicht. Die Verwendung höherer $MgCl_2$ -Konzentrationen (bis 5 mM) führte zu einer starken Abnahme der DNA-Bindung.

8. $CuCl_2$ hemmte die DNA-Bindung vollständig. Alle anderen Metallkationen, die in dieser Versuchsreihe untersucht wurden, hatten in der hier verwendeten Konzentration (5 mM) keinen Einfluß auf die DNA-Bindung.

9. T-Antigen wurde aus drei verschiedenen Expressionssystemen über Affinitätschromatographie angereichert. Das dabei isolierte T-Antigen konnte bis zu einer Konzentration von 80 $\mu g/ml$ gereinigt werden. Die biochemische Aktivität des Proteins ging aber in zwei unterschiedlichen Elutionsbedingungen zum Teil verloren. Deshalb soll die Methode zur T-Antigen-Reinigung noch weiter verfeinert werden.

10. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in einem übersichtlichen Modell zusammengefaßt, das die Oligomerisierung des T-Antigens mit der Origin-DNA-Bindungsaktivität in Zusammenhang bringt.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, J.** 1981. Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product.
Cytochem. 29: 775.
- Arthur, A. K., Höss, A. and Fanning, E.** 1988. Expression of simian virus 40 antigen in *Escherichia coli*: Localization of T antigen origin DNA-binding domain to within 129 amino acids.
J. Virol. 62: 1999-2006.
- Baumann, E. A. and Hand, R.** 1982. Phosphorylation and dephosphorylation alter the structure of D2 hybrid T antigen.
J. Virol. 44: 78-87.
- Baumgartner, I., Kuhn, C. and Fanning E.** 1979. Identification and characterization of fast-sedimenting SV40 nucleoprotein complexes.
Virology 96: 54-63.
- Berg, J.** 1986. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins.
Science 232: 485-486.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, R. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L. and Boyer, H. W.** (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.
Gene 2: 95-113.
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Bradley, M. K., Griffin, J. and Livingston, D. M.** 1982. Relationship of oligomerization to enzymatic and DNA binding properties of the SV40 large T antigen.
Cell 28: 125-134.

- Bradley, M. K., Hudson, J., Villanueva, M. and Livingston, D. M. 1984. Specific in vitro adenylylation of the simian virus 40 large T antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6574-6578.
- Bradley, M. K., Smith, T. F., Lathrop, R. H., Livingston, D. M. and Webster, T. A. (1987). Consensus topography in the ATP binding site of the simian virus 40 and polyomavirus large tumor antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 4026-4030.
- Brady, J. and Khoury, G. 1985. Transactivation of the simian virus 40 late transcription unit by T antigen. Mol. Cell. Biol. 5: 1391-1399.
- Brady, J., Bolen, J., Radonovich, M., Salzman, N. and Khoury, G. 1984. Stimulation of simian virus 40 late gene expression by simian virus 40 tumor antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2040-2044.
- Braithwaite, A. W., Sturzbecher, H.-W., Addison, C., Palmer, C., Rudge, K. and Jenkins, J. R. (1987). Mouse p53 inhibits SV40 origin-dependent DNA replication. Nature 329: 458-460.
- Carswell, S. and Alwine, J. C. (1986). Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP 1, the major capsid protein. J. Virol. 60: 1055-1061.
- Clark, R., Lane, D. P. and Tjian, R. 1981. Use of monoclonal antibodies as probes of simian virus 40 T antigen ATPase activity. J. Biol. Chem. 256: 11854-11858.
- Clark, R., Peden, K., Pipas, J., Nathans, D. and Tjian, R. 1983. Biochemical activities of T antigen proteins encoded by simian virus 40 A gene deletion mutants. Mol. Cell. Biol. 3: 220-228.
- Clerfant, P. and Cuzin, F. (1982). Covalent affinity labeling by periodate-oxidized (α -³²P)ATP of the large-T proteins of polyoma and SV40 Viruses. J. Biol. Chem. 257: 6300-6305.

- Clerant, P. and Seif, I.** (1984). A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins?
Nature 311: 276-279.
- Cole, C. N., Tornow, J., Clark, R. and Tjian, R.** 1986. Properties of the simian virus 40 (SV40) large T antigens encoded by SV40 mutants with deletions in gene A.
J. Virol. 57: 539-546.
- Covey, L., Choi, Y. and Prives, C.** 1984. Association of simian virus 40 T antigen with the nuclear matrix of infected and transformed monkey cells.
Mol. Cell. Biol. 4: 1384-1392.
- Deb, S. P. and Tegtmeyer, P.** (1987). ATP enhances the binding of simian virus 40 large T antigen to the origin of replication.
J. Virol. 61: 3649-3654.
- Defendi, V. and Jensen, F.** (1967). Oncogenicity by DNA tumor viruses: Enhancement after ultraviolet and cobalt 60 radiations.
Science 157: 703-705.
- DeLucia, A. L., Lewton, B. A., Tjian, R. and Tegtmeyer, P.** 1983. Topography of simian virus 40 A protein-DNA complexes: Arrangement of pentanucleotide interaction sites at the origin of replication.
J. Virol. 46: 143-150.
- DePamphilis, M. L. and Bradley, M. K.** (1986). Replication of SV40 and polyoma virus chromosomes.
In: N. Salzman ed., The Papovaviridae. Vol. 1.
Plenum Publishing Corporation.
- Deppert, W., Hanke, K. and Henning, R.** 1980. Simian virus 40 T antigen-related cell surface antigen: Serological demonstration on simian virus 40-transformed monolayer cells *in situ*.
J. Virol. 35: 505-518.
- DiMaio, D. and Nathans, D.** 1980. Cold-sensitive regulatory mutants of simian virus 40.
J. Mol. Biol. 140: 129-142.

- DiMaio, D. and Nathans, D.** 1982. Regulatory mutants of simian virus 40: Effect of mutations at a T antigen binding site on DNA replication and expression of viral genes.
J. Mol. Biol. 166: 531-548.
- Dixon, R. and Nathans, D.** 1985. Purification of simian virus 40 large T antigen by immunoaffinity chromatography.
J. Virol. 53: 1001-1004.
- Dodson, M., Dean, F. B., Bullock, P., Echols, H. and Hurwitz, J.** (1987). Unwinding of duplex DNA from the SV40 origin of replication by T antigen.
Science 238: 964-967.
- Dorn, A., Brauer, D., Otto, B., Fanning, E. and Knippers, R.** 1982. Subclasses of simian virus 40 large tumor antigen. Partial purification and DNA binding properties of two subclasses of tumor antigen from productively infected cells.
Eur. J. Biochem. 128: 53-62.
- Dulbecco, R. and Freeman, G.** 1959. Plaque production by the polyoma virus.
Virology 8: 396-397.
- Dynan, W. S. and Tjian, R.** 1983. Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II.
Cell 32: 669-680.
- Dynan, W. S. and Tjian, R.** 1983. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter.
Cell 35: 79-87.
- Ey, P. L., Prowse, S. J. and Jenkin, C. R.** 1978. Isolation of pure IgG 1, IgG 2a and IgG immunoglobulins from mouse serum using Protein-A-Sepharose.
Immunochemistry 15: 429-436.
- Evans, R. M. and Hollenberg, S. M.** 1988. Zinc fingers: guilt by association.
Cell 52: 1-3.

- Fanning, E., Nowak, B. and Burger, C. 1981. Detection and characterization of multiple forms of simian virus 40 large T antigen.
J. Virol. 37: 92-102.
- Fanning, E., Westphal, K.-H., Brauer, D. and Corlin, D. 1982. Subclasses of simian virus 40 large T antigen: Differential binding of two subclasses of T antigen from productively infected cells to viral and cellular DNA.
EMBO J. 1: 1023-1028.
- Fanning, E., Burger, C., Huber, B., Markau, U., Sperka, S., Thompson, S., Vakalopoulou, E. and Vogt, B. 1984. How does SV40 T antigen control initiation of viral DNA replication?
Advances in Experimental Medicine and Biology, 179: 241-249.
- Fanning, E. and Vogt, B. 1986. A new biochemical property of SV40 large T antigen.
Cancer Cells 4/DNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Fey, G., Lewis, J. B., Grodzicker, T. and Bothwell, A. 1979. Characterization of a fused protein specified by the Adenovirus type 2-simian virus 40 hybrid Ad2*ND1dp2.
J. Virol. 30: 201-227.
- Fiers, W., Contreras, R., Haegemann, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G. and Ysebaert, M. 1978. Complete nucleotide sequence of SV40 DNA.
Nature 273: 113-120.
- Frankel, A. D. and Pabo, C. O. 1988. Fingering too many proteins.
Cell 53: 675.
- Gannon, J. V. and Lane, D. P. (1987). p53 and DNA polymerase α compete for binding to SV40 T antigen.
Nature 329: 456-458.
- Gardiner, G. R. and Stockdale, H. (1975). Two tissue culture media for production of lepidopteran cells and nuclear polyhedrosis viruses.
J. Invertebr. Pathol. 25: 363-370.

- Gey, G. O., Coffman, W. D. and Kubicek, M. T.** 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium.
Cancer Res. 12: 264-265.
- Giacherio, D. and Hager, L. P.** 1979. A poly(dt)-stimulated ATPase activity associated with simian virus 40 large T antigen.
J. Biol. Chem. 245: 8113-8116.
- Gidoni, D., Scheller, A., Barnet, B., Hantzopoulos, P., Oren, M. and Prives, C.** 1982. Different forms of simian virus 40 large tumor antigen varying in their affinities for DNA.
J. Virol. 42: 456-466.
- Gluzman, Y.** 1981. SV40-transformed simian virus cells support the replication of early SV40 mutants.
Cell 23: 175-182.
- Graessmann, A., Graessmann, M., Tjian, R. and Topp, W. C.** 1980. Simian virus 40 small-t protein is required for loss of actin cable networks in rat cells.
J. Virol. 33: 1182-1191.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W. C. and Nairn, R.** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human Adenovirus type 5.
J. Gen. Virol. 36: 59-72.
- Greenspan, D. and Carroll, R.** 1981. Complex of simian virus 40 large tumor antigen and 48,000-dalton host tumor antigen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 105-109.
- Gurney, E. G., Tamowsky, S. and Deppert, W.** 1986. Antigenic binding sites of monoclonal antibodies specific for simian virus 40 large T.
J. Virol. 57: 1168-1172.
- Hanks, J. M. and Wallace, D. E.** 1949. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71: 196.

- Hansen, U., Tenen, D., Livingston, D. M. and Sharp, P. A. 1981. T antigen repression of SV40 early transcription from two promoters. *Cell* 27: 603-612.
- Harlow, E., Crawford, L. V., Pim, D. C. and Williamson, N. M. 1981. Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. *J. Virol.* 39: 861-869.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem development unit: I. staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9: 28-32.
- Hinzpeter, M., Fanning, E. and Deppert, W. 1986. A sensitive target-bound DNA binding assay for SV40 large T antigen. *Virology* 148: 159-167.
- Hirt, B. 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26: 365-369.
- Hooft van Iddenkinge, B. J. L., Smith, G. E. and Summers, M. D. 1983. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 131: 561-565.
- Huber, B., Vakalopoulou, E., Burger, C. and Fanning, E. 1985. Identification and biochemical analysis of DNA replication-defective large T antigens from SV40-transformed cells. *Virology* 146: 188-202.
- Jessel, D., Landau, T., Hudson, J., Lalor, T., Tenen, D. and Livingston, D. M. 1976. Identification of regions of the SV40 genome which contain preferred SV40 T antigen-binding sites. *Cell* 8: 535-545.
- Jones, K. A. and Tjian, R. 1984. Essential contact residues within SV40 large T antigen binding site I and II identified by alkylation-interference. *Cell* 36: 155-162.

- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. and Smith, A. E. 1984.
Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40
large T antigen.
Nature 311: 33-38.
- Keller, J. M. and Alwine, J. C. 1984. Activation of the SV40 late promoter.
Direct effects of T antigen in the absence of viral DNA replication.
Cell 36: 381-389.
- Keller, J. M. and Alwine, J. C. 1985. Analysis of an activatable promoter:
Sequences in the simian virus 40 late promoter required
for T antigen mediated transactivation.
Mol. Cell. Biol. 5: 1859-1869.
- Kessler, S. W. 1975. Rapid isolation of antigens from cells with a
Staphylococcal protein A-antibody absorbent: Parameters of
the interaction of antibody-antigen complexes with protein A.
J. Immunol. 115: 1617-1624.
- Klug, A. and Rhodes D. 1987. "Zinc-fingers": a novel protein motif for
nucleic acid recognition.
TIBS 12: 464-469.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly
of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680-685.
- Lanford, R. E. 1988. Expression of simian virus 40 T antigen in insect cells:
Using a baculovirus expression vector.
In press.
- Lazdunski, C. and Lazdunski, M. (1966). Etude cinetique du mecanisme
d'action catalytique de la phosphatase alcaline d'E. coli.
Biochim. Biophys. Acta 113: 551-566.
- Lewis, A. M. J. and Martin, R. G. 1979. Oncogenicity of simian virus 40
deletion mutants that induce altered 17-kilodalton t-proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4299-4302.
- Livingston, D. M. and Bradley, M. K. (1987). The simian virus 40 large
T Antigen: A lot packed into a little.
Mol. Biol. Med. 4: 63-80.

- Logan, J. and Shenk, T.** 1984. Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3655-3659.
- Luckow, V. A. and Summers, M. D.** 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors.
Bio/Technology 6: 47-55.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.** 1982. Molecular Cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N. Y.
- Manos, M. M. and Gluzman, Y.** 1985. Genetic and biochemical analysis of transformation-competent, replication-defective simian virus 40 large T antigen mutants.
J. Virol. 53: 120-127.
- Margolskee, R. and Nathans, D.** 1984. Simian virus 40 mutant T antigens with relaxed specificity for the nucleotide sequence at the viral origin of DNA replication.
J. Virol. 49: 386-393.
- Martin, R. G., Wetlow, V. P., Edwards, C. A. F. and Vembu, D.** 1979. The roles of the simian virus 40 tumor antigens in transformation of Chinese hamster lung cells.
Cell 17: 635-643.
- Martin, R. G.** 1981. The transformation of cell growth and transmembrification of DNA synthesis by simian virus 40.
Advances in Cancer Research 34: 1-68
- Marx, J. L.** 1988. Zipping up DNA binding proteins.
Science 240: 1732.
- Mastrangelo, I. A., Hough, P. V. C., Wilson, V. G., Wall, J. S., Hainfeld, J. F. and Tegtmeyer, P.** 1985. Monomers through trimers of large tumor antigen bind in region II of simian virus 40 origin of replication DNA as stable structures in solution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3626-3630.
- Miller, J. H.** (1972). Experiments in Molecular Genetics.
Cold Spring Harbor Laboratory

- McKay, R. D. G.** 1981. Binding of a simian virus 40 T antigen-related protein to DNA.
J. Mol. Biol. 145: 471-488.
- Melnick, J. L.** 1962. Papova virus group.
Science 135: 1128.
- Montenarh, M. and Henning, R.** 1983. Disaggregation and reconstitution of oligomeric complexes of simian virus 40 large T antigen.
J. Gen. Virol. 64: 241-246.
- Montenarh, M. and Henning, R.** 1983. Self-assembly of simian virus 40 large T antigen oligomers by divalent cations.
J. Virol. 45: 531-538.
- Myers, R., Williams, R. and Tjian, R.** 1981. Oligomeric structure of a simian virus 40 T antigen in free form and bound to DNA.
J. Mol. Biol. 148: 347-353.
- Ochs, D.** (1983). Protein contaminants of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels.
Analyt. Biochem. 135: 470-474.
- Oren, M., Winocour, E. and Prives, C.** 1980. Differential affinities of simian virus 40 large tumor antigen for DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 220-224.
- Paucha, E., Kalderon, D., Harvey, R. and Smith, A. E.** 1986. Simian virus 40 origin DNA-binding domain on large T antigen.
J. Virol. 57: 50-64.
- Polvino-Bodnar, M. and Cole, C. N.** 1982. Construction and characterization of viable deletion mutants of simian virus 40 lacking sequences near the 3' end of the early region.
J. Virol. 43: 489-502.
- Pope, J. H. and Rowe, W. P.** 1964. Detection of specific antigen in SV40-transformed cells by immunofluorescence.
J. Exp. Med. 120: 121-128.
- Prives, D., Beck, Y. and Shure, H.** 1980. DNA binding properties of simian virus 40 T antigens synthesized in vivo and in vitro.
J. Virol. 33: 689-696.

- Prives, D., Barnet, B., Scheller, A., Khoury, G. and Jay, G. 1982. Discrete regions of simian virus 40 large T antigen are required for nonspecific and viral origin-specific DNA binding. *J. Virol.* 43: 73-82.
- Reddy, V. B., Thimmappaya, B., Dhar, R., Subraminian, K. N., Zain, B. S., Pan, J., Ghosh, P. K., Celma, M. L. and Weissmann, S. M. 1978. The genome of simian virus 40. *Science* 200: 494-502.
- Reed, S. I., Ferguson, J., Davis, R. W. and Stark, G. R. 1975. T antigen binds to simian virus 40 DNA at the origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1605-1609.
- Resnick, J. and Shenk, T. (1986). Simian virus 40 agnoprotein facilitates normal nuclear location of the major capsid polypeptide and cell-to-cell spread of virus. *J. Virol.* 60: 1098-1106.
- Rigby, P. and Lane, D. 1983. The structure and function of SV40 large T antigen. *Adv. Viral Oncology* 3: 31-57.
- Rio, D., Robbins, A., Meyers, R. and Tjian, R. 1980. Regulation of simian virus 40 early transcription *in vitro* by purified tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5706-5710.
- Robb, J. and Huebner, K. 1973. Effect of cell chromosome number on simian virus 40 replication. *Exp. Cell Res.* 81: 120-126.
- Runzler, R., Thompson, S. and Fanning, E. 1987. Oligomerization and origin DNA-binding activity of simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 61: 2076-2083.
- Ryder, K., Vakalopoulou, E., Mertz, R., Mastrangelo, I. Hough, P., Tegtmeyer, P. and Fanning, E. 1985. Seventeen base pairs of region I encode a novel tripartite binding signal for SV40 T antigen. *Cell* 42: 539-548.

- Ryder, K., Silver, S., DeLucia, A. L., Fanning, E. and Tegtmeyer, P.** 1986. An altered DNA conformation in origin region I is a determinant for the binding of SV40 large T antigen. *Cell* 44: 719-725.
- Scatchard, G.** 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 660-672.
- Scheidtmann, K.-H., Echle, B. and Walter, G.** 1982. Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J. Virol.* 44: 116-133.
- Scheidtmann, K.-H., Hardung, M., Echle, B. and Walter, G.** 1984. DNA binding activity of simian virus 40 large T antigen correlates with a distinct phosphorylation state. *J. Virol.* 50: 1-12.
- Scheller, A., Covey, L., Barnet, B. and Prives, C.** 1982. A small subclass of SV40 T antigen binds to the viral origin of replication. *Cell* 29: 375-383.
- Schirmbeck, R. and Deppert, W.** 1988. Analysis of large T antigen binding to binding sites I and II on the SV40 ORI-region. In press
- Shalloway, D., Kleinberger, T. and Livingston, D. M.** 1980. Mapping of SV40 DNA replication origin region binding sites for the SV40 T antigen by protection against exonuclease III digestion. *Cell* 20: 411-422.
- Shortle, D. and Nathans, D.** 1979. Regulatory mutants of simian virus 40: Constructed mutants with base substitutions of the origin of viral DNA replication. *J. Mol. Biol.* 131: 801-817.
- Shortle, D., Margolskee, R. and Nathans, D.** 1979. Mutational analysis of the simian virus 40 replicon: Pseudorevertants of mutants with a defective replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6128-6131.

- Simanis, V. and Lane, D. P.** 1985. An immunoaffinity purification procedure for SV40 large T antigen.
Virology 144: 88-100.
- Simmons, D. T.** 1986. DNA-binding region of the simian virus 40 tumor antigen.
J. Virol. 57: 776-785.
- Sleigh, M. J., Topp, W. C., Hanich, R. and Sambrook, J. F.** 1978. Mutants of SV40 with an altered small t protein are reduced in their ability to transform cells.
Cell 14: 79-88.
- Smith, G. E., Summers, M. D. and Fraser, M. J.** 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector.
Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165.
- Solnick, D.** 1981. Construction of an Adenovirus-SV40 recombinant producing SV40 T antigen from an Adenovirus late promoter.
Cell 24: 135-143.
- Soule, H. R. and Butel, J. S.** 1979. Subcellular localization of simian virus 40 large tumor antigen.
J. Virol. 30: 523-532.
- Stahl, H., Dröge, P. and Knippers, R.** 1986. DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen.
EMBO J. 5: 1939-1944.
- Staufenbiel, M. and Deppert, W.** 1983. Different structural systems of the nucleus are targets for SV40 large T antigen.
Cell 33: 173-181.
- Stillman, B. W. and Gluzman, Y.** 1985. Replication and supercoiling of simian virus 40 DNA in cell extracts from human cells.
Mol. Cell. Biol. 5: 2051-2060.
- Summers, M. D. and Smith, G. E.** 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures.
Tex. Agric. Exp. Stn. Bull. 1555: 1-56.
- Sweet, B. H. and Hilleman, M. R.** (1960). The vacuolating virus, SV40.
Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 105: 420.

- Takemoto, K. H., Kirschstein, R. L. and Habel, K.** 1966. Mutants of simian virus 40 differing in plaque sizes, oncogenicity and heat sensibility. *J. Bacteriol.* 92: 990-994.
- Tasheva, B. and Dessev, G.** (1983). Artifacts in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis due to 2-mercaptoethanol. *Analyt. Biochem.* 129: 98-102.
- Tegtmeyer, P.** 1975. Function of simian virus 40 gene A in transforming infection. *J. Virol.* 15: 613-618.
- Tegtmeyer, P., Andersen, B., Shaw, S. B. and Wilson V. G.** 1981. Alternative interactions of the SV40 protein with DNA. *Virology* 115: 75-87.
- Tegtmeyer, P., Lewton, B. A., DeLucia, A. L., Wilson, V. G. and Ryder, K.** 1983. Topography of simian virus 40 A protein-DNA complexes: Arrangement of protein bound to the origin of replication. *J. Virol.* 46: 151-161.
- Thompson, S. L.** 1984. Specific DNA binding and oligomerization of simian virus 40 large T antigen. Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Tjian, R.** 1978. The binding site on SV40 DNA for a T antigen-related protein. *Cell* 13: 165-179.
- Tjian, R.** 1981. T antigen binding and the control of gene expression. *Cell* 26: 1-2.
- Tooze, J.** 1981. Molecular Biology of Tumor Viruses: Part 2, DNA Tumor Viruses, 2nd, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Topp, W. C. and Rifkin, D. B.** 1980. The small-t protein of SV40 is required for loss of actin cable networks and plasminogen activator synthesis in transformed rat cells. *Virology* 106: 282-291.

- Topp, W. C., Rifkin, D. B. and Sleight, M. J.** 1981. SV40 mutants with an altered small-t protein are tumorigenic in newborn hamsters. *Virology* 111: 341-350.
- Tornow, J., Polvino-Bodnar, M., Santangelo, G. and Cole, C. N.** 1985. Two separable functional domains of simian virus 40 large T antigen: Carboxyl-terminal region of simian virus 40 large T antigen is required for efficient capsid protein synthesis. *J. Virol.* 53: 415-424.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Twigg, A. and Sherratt, D.** 1980. Trans-complementable copy number mutants of plamid ColEI. *Nature* 283: 216-218.
- Vogt, B., Vakalopoulou, E. and Fanning, E.** 1986. Allosteric control of SV40 T antigen binding to viral origin DNA. *J. Virol.* 58: 765-772.
- Wachter, M., Riedle, G. and Henning, R.** 1985. Functional implication of oligomerization of simian virus 40 large T antigen during lytic virus infection. *J. Virol.* 56: 520-526.
- Weber, K. and Osborn, M.** 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
- Wiekowski, M., Dröge, P. and Stahl, H.** (1987). Monoclonal antibodies as probes for a function of large T antigen during the elongation process of simian virus 40 DNA replication. *J. Virol.* 61: 441-448.
- Wray, W., Bouliskas, T., Wray, V. P. and Hancock, R.** 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 118: 197-203.

8. Verzeichnis der Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidisulfat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie (1 Ci = 3.7×10^{10} Bequerel)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
DME	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hpi	Stunden nach Infektionsbeginn
kD	Kilodalton
NBT	Nitro blue tetrazolium
NP-40	Nonidet P-40
ORI	Replikationsstartpunkt
pfu	Plaque bildende Einheit
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur (20-25°C)
S	Svedberg Konstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monoaurat
U	Enzymeinheit (units)
Upm	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp

L E B E N S L A U F

Persönliche Daten

Name	Runzler
Vorname	Robert Horst
Wohnort	Horemansstr. 24 B, 8000 München 19
Geburtsdatum/-ort	18.11.1955 in München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Gerlinde Huth, gesch. Runzler, geb. Hofmann Horst Runzler, Dipl.-Ing. (FH)

Schulbildung

1962-1967	Volksschule am Marsplatz
1967-1977	Rupprecht-Gymnasium München (math.-nat.)

Studium

ab WS 77/78	Studium Geologie/Palaeontologie
ab WS 78/79	Biologie/Chemie Lehramt an höheren Schulen
Juni 80	Vordiplom im Fach Biologie
März 82	Prüfung in Erziehungswissenschaften
Herbst 83 - März 84	Zulassungsarbeit zur wissenschaftlichen Prüfung an höheren Schulen im Zoologischen Institut der Universität München, Abteilung Prof. Dr. B. Linzen unter der Anleitung von Dr. J. Markl; Thema: "Immunologische Untersuchungen am Hämocyanin als Beitrag zur Phylogenie der Spinnen"
Sept. - Dez. 83	Wissenschaftl./künstl. Prüfung für das Lehramt an Gymnasien in Zoologie/Botanik
WS 83/84	Diplomhauptprüfung im Fach Biologie Hauptfach: Zoologie Nebenfächer: Botanik, Organ. Chemie
Juni 83 - April 84	Diplomarbeit im Zoologischen Institut der Universität München, Abteilung Prof. Dr. B. Linzen unter der Anleitung von Dr. J. Markl; Thema: "Immunologische Untersuchungen am Hämocyanin als Beitrag zur Phylogenie der Spinnen" (Weiterführende Untersuchungen)
Juli 84 - Sept. 88	Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. E. Fanning; Thema: "Drei T-Antigen-Subklassen des Simian Virus 40 aus lytisch infizierten Zellen: Oligomerisierung, Origin-DNA-Bindung, Versuche zur Reinigung"

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12 (3) der Promotionsordnung vom 5.3.1981 von Frau Prof. Dr. E. Fanning-Honegger betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 14. September 1988

A handwritten signature in dark ink, reading "Robert Ranzler". The signature is written in a cursive style with a large, sweeping initial 'R' and a long, horizontal flourish extending to the right.

